

# **Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf NOD2-abhängige Signalwege**



## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Simone Lipinski**

Kiel, Oktober 2008

Diese Arbeit entstand von Oktober 2005 bis Oktober 2008 in der Arbeitsgruppe Zellbiologie am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und wurde durch Mittel des GRK 820 gefördert.

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Koreferent: Prof. Dr. Philip Rosenstiel

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

---

Der Dekan

Meiner Familie



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die intestinale Barriere und das angeborene Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1	PAMP-Rezeptoren des angeborenen Immunsystem	4
1.1.2	Funktion und Signaltransduktion von NOD2	8
1.1.3	Bedeutung von NOD2 für die intestinale Barriere	12
1.1.4	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	13
1.2	<b>Reaktive Sauerstoffspezies</b>	<b>15</b>
1.2.1	ROS als intrazelluläre Botenstoffe	16
1.2.2	Die Familie der NADPH-Oxidasen (NOX)	17
1.2.3	Interaktionen zwischen NOX-Enzymen und Toll-like-Rezeptoren	20
1.3	<b>Zielsetzungen</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>22</b>
2.1.1	Zelllinien	22
2.1.2	Isolierung primärer muriner Kolonepithelzellen	23
2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	23
2.1.4	Bestimmung der Zellviabilität	23
2.1.5	Aussaat und Ernte der Zellen	23
2.1.6	Transfektion von eukaryotischen Zellen	24
2.1.7	Zellinvasions-Assays	25
2.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.2.3	Isolierung von genomischer DNA	27
2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA	27
2.2.5	Qualitätskontrolle der RNA	28
2.2.6	cDNA-Synthese	29
2.2.7	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.2.8	Herstellung von Überexpressionskonstrukten	30
2.3	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>35</b>
2.3.1	Herstellung von Gesamtproteinlysaten	35
2.3.2	Quantitative Proteinbestimmung	35
2.3.3	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	35
2.3.4	Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western-Blot)	37
2.3.5	Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz	37
2.3.6	Koimmunpräzipitation	38

2.3.7	Rac1 Aktivierungs-Assay .....	39
2.3.8	ELISA .....	39
<b>2.4</b>	<b>Detektion reaktiver Sauerstoffspezies.....</b>	<b>40</b>
2.4.1	cDCF-Assay .....	40
2.4.2	Luminol-Assay .....	41
2.4.3	Bodipy-Messung.....	41
<b>2.5</b>	<b>Immunhistochemische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.5.1	Zellfixierung mit Paraformaldehyd.....	42
2.5.2	Färbung von intrazellulären Proteinen und nukleärer DNA .....	42
<b>2.6</b>	<b>Reportergenassay.....</b>	<b>43</b>
<b>2.7</b>	<b>Bildanalyse mit ImageJ .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>ROS als Mediatoren der NOD2-Signaltransduktion .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Epithelzellen produzieren ROS nach MDP-Stimulation .....	44
3.1.2	NOD2-defiziente murine Kolonepithelzellen zeigen eine verminderte ROS-Produktion ....	46
3.1.3	Antioxidantien vermindern die NOD2-abhängige NF-κB-Aktivierung .....	46
3.1.4	DPI vermindert die NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8-Sekretion .....	48
3.1.5	siRNA-vermittelter NOX1-, NOX4- oder DUOX2- <i>knockdown</i> .....	48
3.1.6	Eine Verminderung von NOX-Enzymen führt zu einer verringerten NOD2-abhängigen ROS-Produktion .....	49
3.1.7	NOX4- <i>knockdown</i> reduziert die NOD2-abhängige IL-8 Sekretion in HEK-293 Zellen .....	50
<b>3.2</b>	<b>Rolle von Rac1 bei der NOD2-vermittelten Signaltransduktion.....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Rac1 wird durch die Stimulation mit MDP und Infektion mit Listerien aktiviert.....	51
3.2.2	Die Überexpression von inaktivem Rac1N17 vermindert die ROS-Produktion und NF-κB- Aktivierung.....	53
<b>3.3</b>	<b>Expression von NADPH-Oxidasen.....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Gewebe- und zelltypspezifische Expression.....	55
3.3.2	Regulation der Expression von <i>NOX1</i> und <i>DUOX2</i> unter pro-inflammatorischen Bedingungen .....	56
3.3.3	Expression von <i>NOX1</i> , <i>DUOX1</i> und <i>DUOX2</i> in Kolonbiopsien von CED-Patienten .....	56
3.3.4	Expression von <i>NOX1</i> , <i>DUOX1</i> und <i>DUOX2</i> in Kolonbiopsien von Mäusen mit DSS- induzierter Kolitis .....	57
3.3.5	Regulation der Expression nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	58
<b>3.4</b>	<b>Interaktion zwischen NOD2 und NOX/DUOX.....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Koimmunpräzipitation von NOD2 und NOX1/DUOX2 .....	59
3.4.2	Kolokalisation von NOD2 mit DUOX2 .....	60
3.4.3	Kolokalisation von NOD2 mit NOX1.....	61

3.5	Rolle der NOX-Enzyme für die NOD2-vermittelte epitheliale Barrierefunktion.....	62
3.5.1	NOX1- oder DUOX2- <i>knockdown</i> erhöht die bakterielle Zellinvasion.....	62
3.5.2	NOD2 und DUOX2 wirken antimikrobiell .....	64
4	Diskussion .....	66
4.1	Kritische Betrachtung der verwendeten Zelllinien und Reagenzien .....	66
4.2	Modulation der NOD2-Signalgebung durch ROS .....	67
4.2.1	ROS als Mediatoren der NOD2-Signalgebung .....	67
4.2.2	Die Rolle von NOX-Enzymen und Rac1 für die NOD2-vermittelte ROS-Produktion .....	68
4.3	Die Rolle der NADPH-Oxidasen für die epitheliale Barriere .....	71
4.4	Die Bedeutung der evolutionären Konservierung von NLRs und NOX-Enzymen .....	73
4.5	Die Rolle der Redox-Homöostase für entzündliche Erkrankungen.....	75
4.5.1	Zusammenhang zwischen der NOD2-Signalgebung und der Redox-Homöostase.....	76
4.5.2	Zusammenhang zwischen CED-Suszeptibilitätsfaktoren und der Redox-Homöostase .....	76
4.5.3	Die Bedeutung der NOD2-vermittelten Redox-Homöostase für die Integrität der intestinale Barriere.....	78
4.6	Ausblick .....	80
5	Zusammenfassung.....	81
6	Abstract.....	82
7	Literaturverzeichnis .....	83
8	Anhang.....	100
8.1	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	100
8.2	Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme .....	101
8.3	Verwendete Kits .....	102
8.4	Vektoren .....	103
8.5	Oligonukleotide .....	104
8.6	Antikörper .....	105
8.7	Abbildungsverzeichnis.....	106
8.8	Tabellenverzeichnis .....	108
8.9	Abkürzungsverzeichnis.....	109
	Erklärung .....	113
	Lebenslauf .....	114
	Publikationen und Tagungsbeiträge .....	115
	Danksagung .....	116

# 1 Einleitung

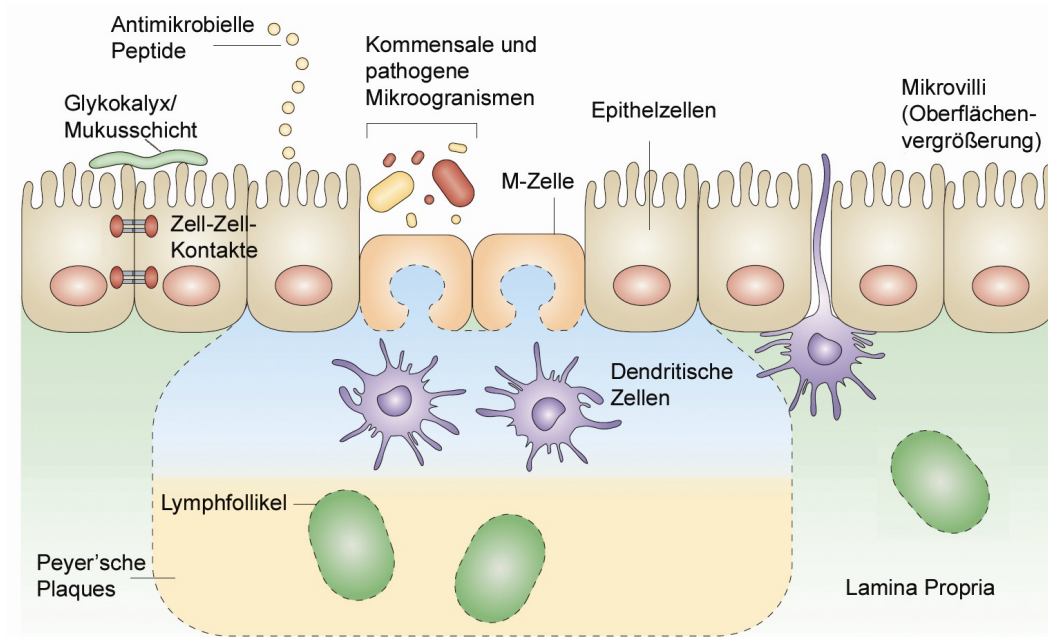
Der Mensch lebt in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. An den Grenzflächen von Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt wehrt der Organismus durch das Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunität potenzielle Krankheitserreger ab.

Seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts ist die Inzidenz von chronisch-entzündlichen Barriereerkrankungen wie Allergien, Asthma, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa angestiegen, während die Inzidenz von akuten Infektionserkrankungen gesunken ist (Bach, 2002). Für einige dieser Erkrankungen wurden die genetischen Determinanten durch wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre identifiziert (Schreiber *et al.*, 2005). Dabei wurde offensichtlich, dass genetisch- und umweltbedingte Störungen der Barrierefunktion ursächlich an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen beteiligt sind. Insbesondere das Darmepithel und die Rezeptoren des angeborenen intestinalen Immunsystems stellen eine der wichtigsten physikalischen und immunologischen Barrieren dar. Inwiefern diese und weitere Faktoren an der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung.

## 1.1 Die intestinale Barriere und das angeborene Immunsystem

Die Bedeutung des Gastrointestinaltrakts für die Immunhomöostase wurde lange Zeit unterschätzt. Neben seiner Funktion, Nährstoffe zu prozessieren und zu resorbieren, dient er als Lebensraum kommensaler Mikroorganismen und ist als größte Grenzfläche zwischen dem Organismus und seiner Umwelt an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Entscheidend hierfür sind zwei Eigenschaften: (1) Die selektive Barriere des Epithels ermöglicht die Nährstoffresorption und verhindert das Eindringen von Makromolekülen und Bakterien. (2) Durch den Prozess der „oralen Toleranz“ lösen Antigene der Nahrung und kommensaler Bakterien eine aktive Suppression der Immunantwort aus, werden also toleriert (Strober *et al.*, 1998).

In den letzten Jahren wurden entscheidende Faktoren der intestinalen Barriere identifiziert und beschrieben: Ein komplexes Zusammenspiel der epithelialen Zell-Zell-Kontakte, Glykokalyx, Mukusschicht, kommensalen Mikroflora, des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes sowie der sezernierten antimikrobiellen Peptiden, Zytokine und weiterer Faktoren sorgt für eine intakte intestinale Barriere und entzündungsfreie Immunregulation (siehe Abbildung 1-1). Ist diese fein regulierte Balance gestört, können pathogene Prozesse wie Entzündungen, Allergien und Krebs begünstigt werden (Artis, 2008; Schreiber *et al.*, 2005).



**Abbildung 1-1: Die intestinale Barriere**

Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach (Artis, 2008).

### Zell-Zell-Kontakte

Unterschiedliche Adhäsionsproteine bilden Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten Epithelzellen aus. Die Transmembranproteine der *Tight Junctions* umfassen die drei Gruppen der Occludine, Claudine und junctionaler Adhäsionsmoleküle. Sie bilden im apikalen Bereich der seitlichen Zellmembran eine Diffusionsbarriere. In basaler Richtung sind die *Adherens Junctions* lokalisiert. Sie vermitteln den interzellulären Kontakt durch E-Cadherine. Diese Transmembranproteine sind unter anderem über  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenine mit verschiedenen Ankerproteinen des Aktin-Zytoskeletts verbunden (Niessen, 2007).

### Glykokalyx

Die Glykokalyx an der apikalen Plasmamembran besteht aus Glykoproteinen. Sie bewirken eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung und erschweren die bakterielle Zellinvasion.

### Mukusschicht

Die Muzine, eine Familie von Glykoproteinen, bilden den strukturgebenden Hauptbestandteil des Mukus. Sie gehören zu den größten und komplexesten bekannten Proteinen. Ihre Polypeptidketten beinhalten lange Seitenketten mit posttranslationalen Modifikationen wie O- und N-Glykosylierungen und C-Mannosylierungen. Über Disulfidbrücken bilden sie Oligo- und Multimere mit Molekulargewichten im Millionenbereich (Hanisch und Muller, 2000). Die gelartige Konsistenz der Muzine resultiert aus der hohen Wasserbindekapazität. Sie entsteht durch die Hydroxylgruppen der Zucker und den anionischen Charakter der negativ geladenen Sialyl- oder Sulfatgruppen (Perez-Vilar und Mabolo, 2007).

### **Kommensale Mikroflora**

Die intestinale Besiedlung des Menschen beginnt unmittelbar nach der Geburt und wird durch genetische und umweltbedingte Faktoren (u.a. Ernährung, Lebensstil) individuell in ihrer Zusammensetzung beeinflusst (Harmsen *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2007; Zoetendal *et al.*, 1998). Während die bakterielle Besiedlung in Magen und Dünndarm mit ca.  $10^3$ - $10^5$  Organismen/ml gering ist, steigt sie im Kolon auf  $10^9$ - $10^{12}$  Bakterien pro ml an (Orrhage und Nord, 2000).

Die symbiontische Beziehung zwischen dem Wirtsorganismus und seiner Darm-assoziierten Mikroflora hat eine entscheidende Rolle für die Funktion der intestinalen Barriere, was klinische und experimentelle Befunde vor allem aus Tierstudien belegen (Hooper und Gordon, 2001). Die kommensalen Bakterien erleichtern die Verdauung und Absorption von Nährstoffen und setzen Stoffwechselprodukte wie kurzkettige Fettsäuren frei, die einen trophischen Effekt auf Enterozyten haben (Gordon und Pesti, 1971). Sie konkurrieren um Nährstoffe und sorgen über sezernierte Moleküle des „*Quorum sensing*“ für stabile Konsortien (Waters und Bassler, 2005). Diese Faktoren bieten möglicherweise einen Schutz vor der Besiedlung mit Pathogenen (Backhed *et al.*, 2005; Guarner und Malagelada, 2003). Noch sind die genauen Mechanismen unklar, aber es ist wahrscheinlich, dass eine veränderte Zusammensetzung der epithelialen kommensalen Flora eine Schlüsselrolle in der Entstehung entzündlicher Barriereerkrankungen hat (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004).

### **Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe**

Die Immunzellen des Darms sind in verschiedenen Strukturen wie Lymphknoten, Lymphfollikeln und den Peyer'schen Plaques (Ileum) organisiert. Einzelne Immunzellen liegen auch verstreut in der *Lamina propria* vor. Die Peyer'schen Plaques werden von strukturell und funktionell spezialisierten Epithelzellen, den M- (*microfold*) Zellen, überlagert. M-Zellen nehmen Antigene und Mikroorganismen aus dem Darmlumen auf und transportieren diese *via* Transzytose zu den basolateral gelegenen dendritischen Zellen und Lymphozyten der Peyer'schen Plaques (Kraehenbuhl und Neutra, 2000). Auch dendritische Zellen können Mikroorganismen direkt aus dem Lumen aufnehmen (Rescigno *et al.*, 2001). Vor allem dienen sie jedoch als Antigen-präsentierende Zellen und kontrollieren die Differenzierung von effektorischen und regulatorischen T-Zellen.

## Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelizidine werden von Immunzellen und Enterozyten exprimiert und gelangen über Exozytose in das Darmlumen (Agerberth und Gudmundsson, 2006; Salzman *et al.*, 2003). Ein postulierter Mechanismus ihrer Wirkung beruht auf der Porenbildung und Lyse der bakteriellen Zellmembran. Diese zeichnet sich im Unterschied zur humanen cholesterinreichen Plasmamembran durch einen hohen Anteil negativ geladener Phospholipide aus. Sie bilden das Angriffsziel der kationischen und lipophilen antimikrobiellen Peptide (Ganz, 2003).

## Zytokine

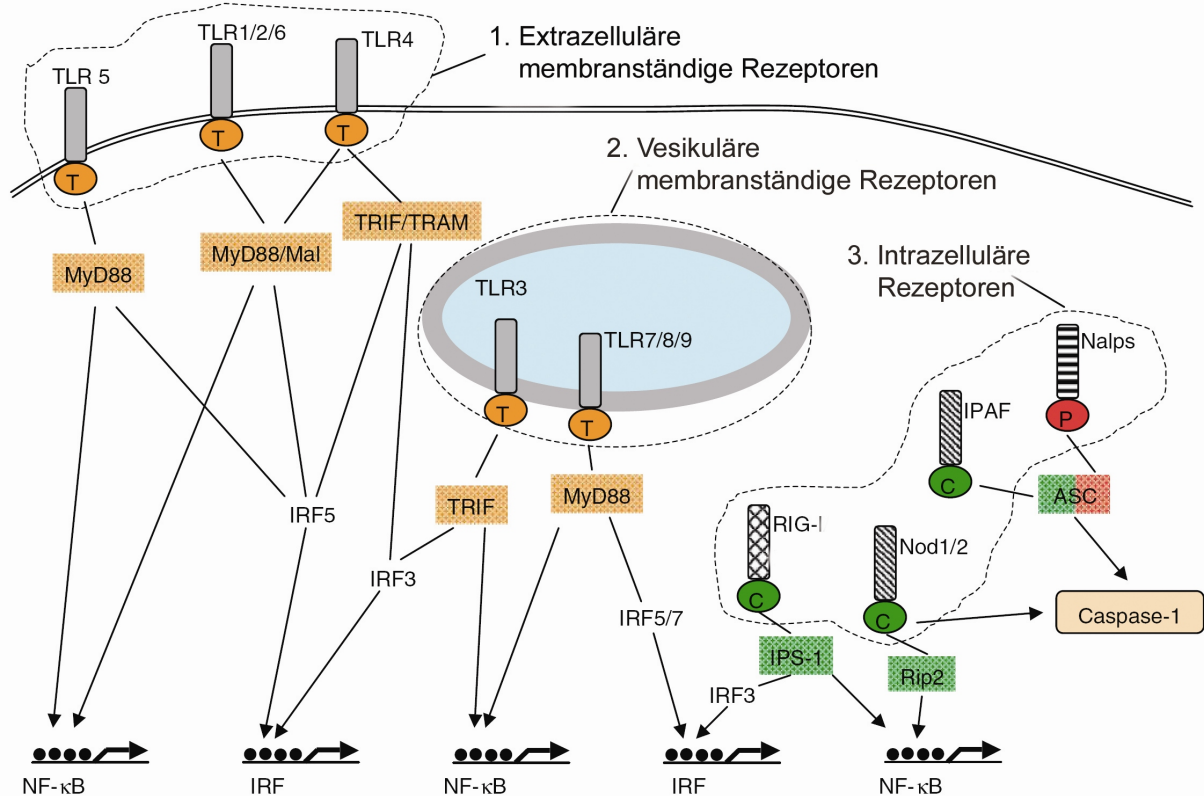
Im gesunden Darm sorgt ein Gleichgewicht zwischen den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -8 und anti-inflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 für eine entzündungsfreie Immunregulation (Nielsen *et al.*, 1996; Nikolaus *et al.*, 1998; Parronchi *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1999). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen überwiegt die Transkription und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, insbesondere TNF- $\alpha$  (Nikolaus *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 1998).

**Weitere protektive Bestandteile** sind die von Immun- und Epithelzellen sezernierten Immunglobuline, vor allem IgA sowie Lactoferrine und Lysozym (Widdicombe, 1995).

### 1.1.1 PAMP-Rezeptoren des angeborenen Immunsystem

Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) unterscheiden sich vor allem auf molekularer Ebene durch bestimmte konservierte Strukturen von eukaryotischen Zellen. Diese sog. Pathogen-assoziierten Muster (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) sind eine Gruppe heterogener (Glyko-) Lipide und Nukleinsäuren, die durch verschiedene Keimbahn-kodierte Immunrezeptoren (PRRs, *pathogen recognition receptor*) erkannt werden. So detektieren die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) Molekülstrukturen von Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen, die zytosolischen RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs) virale Nukleinsäuren und die Familie der NBD-LRR-Rezeptoren oder NOD-like-Rezeptoren (NLRs) die Auf- bzw. Abbauprodukte von bakteriellen Zellwandbestandteilen wie Peptidoglykan (PG).

Wird ein PAMP erkannt, löst dies eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade aus, mit dem Ziel das Pathogen zu eliminieren. Dabei rekrutieren alle Rezeptoren Adaptermoleküle. Diese wiederum rekrutieren Kinasen, Transkriptionsfaktoren und weitere assoziierte Moleküle, um letztlich die Expression von Genen zu steuern, die als Schlüsselfaktoren die Immunantwort regulieren. Eine Übersicht der Immunrezeptoren und der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine zeigt die Abbildung 1-2.



**Abbildung 1-2: Subzelluläre Lokalisation ausgewählter PAMP-Rezeptoren und an der Signaltransduktion beteiligter Proteine.**

Die membranständigen Toll-like-Rezeptoren sind extrazellulär in der Plasmamembran oder intrazellulär in Vesikelmembranen verankert, die TIR-Domäne (T) ist dabei luminal ausgerichtet. Zu den intrazellulären Sensoren gehören die RIG-I-Rezeptoren und die NLRs. Alle drei Gruppen rekrutieren Adaptermoleküle, die wiederum eine Signalkaskade initiieren. Die TIR-abhängige Signaltransduktion führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, IRFs und weiteren Signalwegen wie p38, JNK und ERK (nicht dargestellt). RIG-I-Rezeptoren induzieren über IPS-1 sowohl NF- $\kappa$ B- als auch IRF-Signalwege. Die NLR Familienmitglieder NOD1 und NOD2 sind an der NF- $\kappa$ B- und Caspase-1-Aktivierung beteiligt. Modifiziert nach (Werts *et al.*, 2006).

## Die Toll-like-Rezeptor Familie

Die Toll-like-Rezeptoren sind Typ-1 Transmembran-Rezeptoren, die an der Plasmamembran oder endosomal lokalisiert sind. Charakteristisch ist ihre Domänenstruktur. Die extrazelluläre (oder extrazytosolische) LRR-Domäne (*leucine-rich repeats*-Domäne) dient als Sensor- und Bindedomäne. Die intrazelluläre TIR- (Toll/IL-1R) Domäne leitet das Signal durch Interaktion mit den TIR-Adaptermolekülen TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) oder MAL (*MyD88-adaptor-like protein*) in das Zytosol weiter und aktiviert p38-, JNK-, NF-κB- und IRF-Signalwege (Moynagh, 2005; Takeda und Akira, 2004). Bisher sind 11 TLRs in Säugern identifiziert, von denen 10 im Menschen exprimiert werden (Takeda und Akira, 2005). Eine Übersicht der Rezeptoren, ihrer Liganden, der rekrutierten Adaptermoleküle und ihrer zellulärer Lokalisation findet sich im Anhang (Tabelle 8-1) (El Hassani *et al.*, 2005).



### Die RIG-I-like-Rezeptor (RLR) Familie und DAI

Das Zytoplasma enthält Proteine, die DNA und RNA von eindringenden Viren erkennen. Virale RNA wird von der RLR-Proteinfamilie erkannt, die aus mindestens zwei Mitgliedern bestehen. RIG-I erkennt 5'-Triphosphat-RNA, MDA5 (nicht in Abbildung 1-2 dargestellt) doppelsträngige RNA. Die RLRs verfügen über eine CARD-Domäne, die IPS-1 rekrutiert, ein Adaptermolekül, das am Mitochondrium verankert ist und über weitere Signaltransduktionsmoleküle die IFN-Gentranskription, MAPK oder NF- $\kappa$ B aktiviert (Yoneyama *et al.*, 2005). Zellen verfügen ebenfalls über zytoplasmatische DNA-Sensoren. Das Protein DAI (nicht in Abbildung 1-2 dargestellt) bindet an doppelsträngige DNA und aktiviert über IRF die IFN-Transkription (Takaoka *et al.*, 2007).

### Die NOD-like-Rezeptor (NLR) Familie

Die Rezeptorfamilie der NLR-Proteine besteht in Säugetieren aus 22 Mitgliedern, die alle über eine dreiteilige Domänenstruktur verfügen und anhand ihrer unterschiedlichen N-terminalen Effektor-Domäne in vier Subfamilien (NLRA, -B, -C und -P) und NLRX unterteilt sind (siehe Tabelle 1-1). Bei dem Vertreter NLRX1 wurde keine Homologie zu den anderen Effektor-Domänen festgestellt.

**Tabelle 1-1: Familie der NLR-Rezeptoren. Modifiziert nach (Ting *et al.*, 2008).**

NLR-Familie	N-terminale Domäne	Vertreter
NLRA	Acidic-Domäne	CIITA
NLRB	BIR-Domäne	NAIP
NLRC	CARD-Domäne	NOD1, NOD2, NLRC3-5
NLRP	Pyrin-Domäne	NLRP1-14
NLRX	X	NLRX1

Neben der N-terminalen Effektor-Domäne besitzen die NLR-Proteine eine zentrale Nukleotid-Binde- und Oligomerisationsdomäne (NOD) und eine C-terminale LRR-Domäne (*leucine-rich repeats*). Der N-terminale Bereich der NOD-Domäne wird auch als NACHT- (*nucleotide-binding domain found in NAIP, CIITA, HET-E and TP1*) Domäne bezeichnet, der C-terminale Bereich als NAD (*NACHT-associated domain*).

Die gegenwärtige Hypothese der NLR-Signalgebung geht von zytosolisch vorliegenden inaktiven Proteinen aus, deren NACHT-Domäne durch die LRR-Domäne sterisch reprimiert wird. Erst durch eine PAMP-induzierte Konformationsänderung, deren biochemische Details bisher ungeklärt sind, wird die NACHT-Domäne freigelegt, kann ein Nukleotid binden und durch Oligomerisierung einen sog. Inflammasom- oder NODosom-Komplex bilden (Faustin und Reed, 2008; Tattoli *et al.*, 2007). Adapter- und Effektormoleküle können an dieser Signalplattform binden und schließlich über weitere Signalmediatoren eine Entzündungsantwort bewirken.

Bakterielle und Wirts-assoziierte Komponenten aktivieren Rezeptoren der NLR-Familie und initiieren die Immunantwort oder Apoptose. Modifiziert nach (Meylan *et al.*, 2006).

Neben diesem intrazellulären Signalweg ist die Inflammasom-induzierte Caspase-1-Aktivierung ein weiterer Mechanismus der NLR-Signalgebung. Verschiedene Pathogene, bakterielle und virale Abbauprodukte sowie Toxine werden durch NALPs, IPAF oder NAIP im Zytosol detektiert und lösen die Bildung der Multiproteinkomplexe aus. Diese können je nach NLR-Familienmitglied in IPAF/NAIP-, NALP1- und NALP2/3-Inflammasom unterschieden werden (Martinon und Tschopp, 2006). Kürzlich wurden eine ganze Reihe von Inflammasom-aktivierenden Molekülen, auch endogenen Ursprungs identifiziert, darunter ATP, Harnsäurekristalle (Martinon *et al.*, 2006), erniedrigte Kaliumkonzentrationen (Petrilli *et al.*, 2007), fremde und wirtseigene RNA und DNA (Muruve *et al.*, 2008), Asbest und Siliziumdioxid (Dostert *et al.*, 2008) sowie UV-Strahlung (Faustin und Reed, 2008). Die ausgelöste Immunantwort kann in Abhängigkeit von Zelltyp und zellulärem Kontext zur Apoptose führen oder das pro-entzündlich wirkende Zytokin IL1- $\beta$  freisetzen.

Im Fall des NALP3-Inflammasoms bindet hierzu das Adaptermolekül ASC, das wiederum Procaspase-1 rekrutiert, die durch autokatalytische Spaltung aktiviert wird. Caspase-1 katalysiert die proteolytische Prozessierung von Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18 in die aktiven Zytokine, die daraufhin sezerniert werden (Martinon, 2007; Martinon *et al.*, 2007).

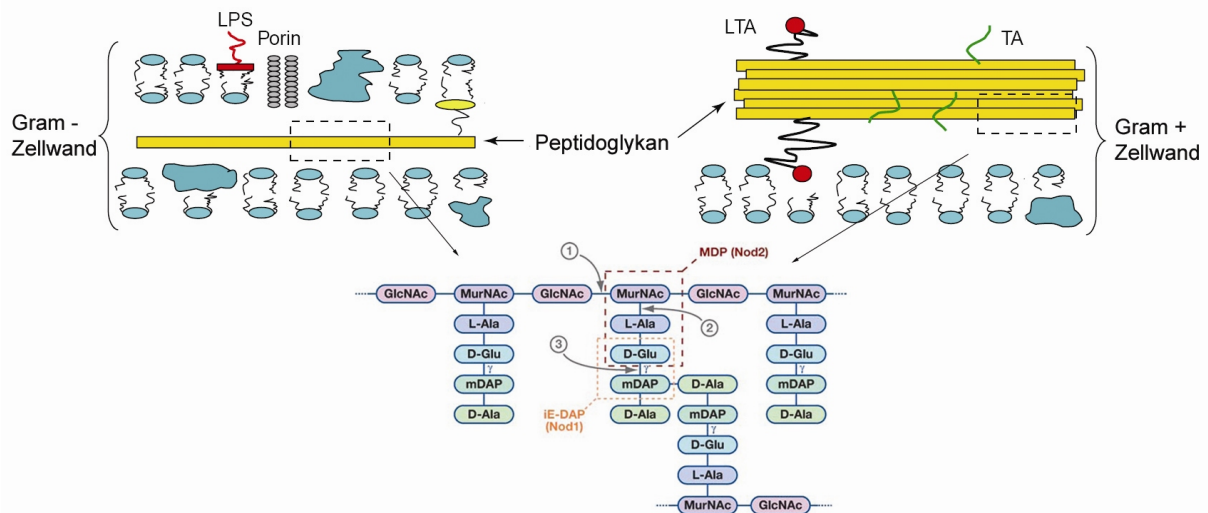
### 1.1.2 Funktion und Signaltransduktion von NOD2

NOD2 wird in Immunzellen wie Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Gutierrez *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001b), wichtigen Effektorzellen des Darm-assoziierten angeborenen Immunsystems. Im entzündungsfreien Darm wird NOD2 von den Paneth-Zellen im Mukosaepithel konstitutiv exprimiert, die an der Basalseite der Krypten vorkommen (Lala *et al.*, 2003). In intestinalen Epithelzellen wird durch TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Stimulation die Expression von NOD2 induziert (Rosenstiel *et al.*, 2003). Das Protein liegt im Zytosol vor, jedoch konnte auch eine Lokalisation an der Plasmamembran nachgewiesen werden, die wahrscheinlich auf Interaktion von NOD2 mit membranständigen Proteinen zurückzuführen ist und deren Rolle nicht ausreichend geklärt ist (Barnich *et al.*, 2005a; Till *et al.*, 2008).

### Die Rolle von Muramyl-dipeptid als Aktivator von NOD2

Inohara und Kollegen verdeutlichten 2001 den Stellenwert der zytosolischen Detektion bakterieller Zellwandbestandteile. Sie vermuteten zunächst, dass die NOD1-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch LPS initiiert wird (Inohara *et al.*, 2001). Erst spätere Arbeiten identifizierten Spaltprodukte von Peptidoglykan als NOD1- und NOD2-Liganden (Girardin *et al.*, 2003a; Girardin *et al.*, 2003b).

Peptidoglykan (PGN) ist ein quervernetztes Polymer aus Kohlenhydratketten und kurzen Peptidbrücken, das ein dreidimensionales Zellgerüst bildet. In der Zellwand gram-positiver Bakterien liegt es zusammen mit Lipoteichonsäure als dicke Schicht (ca. 15-50 nm) vor. Die Zellwand gram-negativer Bakterien enthält ebenfalls PGN, die eine dünne Schicht (ca. 3-8 nm) bildet und von Lipopolysacchariden überlagert ist (Glauert und Thornley, 1969). Das Rückgrat des PGN-Moleküls besteht aus den sich abwechselnden, 1-4  $\beta$ -glykosidisch verknüpften Aminosukcern N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Die Quervernetzung erfolgt durch kovalente Bindung von Oligopeptidketten an MurNAc, die sich in Art und Anzahl ihrer Aminosäuren von Spezies zu Spezies unterscheiden. Während die Zusammensetzung und Struktur des PGN in gram-negativen Bakterien relativ konstant ist, gibt es zwischen gram-positiven Spezies große Variationen (Schleifer und Kandler, 1972). Konserviert in fast allen Bakterien ist die minimale PGN-Struktur MurNAc-L-Ala-D-Glu (Muramyl-dipeptid, MDP). Die NOD2-Aktivierung wird spezifisch durch diese Konfiguration ausgelöst, das MDP-Enantiomer MurNAc-D-Ala-D-Glu wird von NOD2 nicht erkannt (Girardin *et al.*, 2003a).



**Abbildung 1-4: Peptidoglykan als Bestandteil der bakteriellen Zellwand.**

Schematische Darstellung der Zellwand gram-positiver und -negativer Bakterien und des Aufbaus von Peptidoglykan aus *E. coli*. Die Minimalstruktur D-Glu-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP, oranger Kasten) wird von NOD1 erkannt, Muramyldipeptid (MDP, roter Kasten) von NOD2. Durch die proteolytische Aktivität von Glykosidasen (1), N-Acetylmuramoyl-L-alanin-Amidasen (2) und p60-Endopeptidasen (3) werden die molekularen Motive freigesetzt. L-Ala: L-Alanin, D-Glu: D-Glutaminsäure, mDAP: meso-Diaminopimelinsäure, D-Ala: D-Alanin. Modifiziert nach (Girardin *et al.*, 2003c; Inohara *et al.*, 2005).

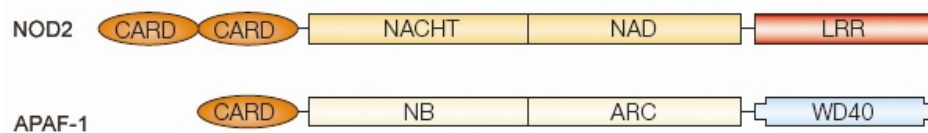
### NOD2-Signalgebung

Zurzeit gibt es nur einzelne Hinweise, wie MDP, unabhängig von direkter bakterieller Invasion, in das Zytosol intestinaler Epithelzellen gelangt. In der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 konnte hPEPT1 als ein möglicher MDP-Transporter identifiziert werden (Vavricka *et al.*, 2004). Der Peptidtransporter hPEPT1 wird hauptsächlich im Dünndarm exprimiert und ist durch eine niedrige Substrataffinität und hohe Transportkapazität gekennzeichnet (Daniel, 2004). Unter pro-inflammatorischen Bedingungen ist seine Expression erhöht und auch im Kolon nachweisbar (Vavricka *et al.*, 2006). Kürzlich zeigte eine Studie, dass MDP in granulären Vesikeln von Makrophagen akkumuliert und nach ATP-Stimulation durch das porenbildende Protein Pannexin-1 in das Zytosol freigesetzt wird (Marina-Garcia *et al.*, 2008).

Auch verfügen Bakterien über Strategien, die ihre Anwesenheit maskieren. Das zytoinvasive Bakterium *Listeria monocytogenes* beispielsweise imitiert eukaryotische Proteine und nutzt das Aktinsystem der Wirtszelle zur Fortbewegung und Infektion von Nachbarzellen aus (Cossart und Sansonetti, 2004). Eine weitere Strategie nutzt das Bakterium *H. pylori*. Es kann in intrazellulären Vakuolen eingeschlossen sein, die einen Kontakt zu den zytosolischen Pathogenrezeptoren verhindern (Amieva *et al.*, 2002). Darüber hinaus lösen nur bestimmte, cagPAI (*cytotoxin associated gene, pathogenicity island*) positive Stämme eine NOD1- oder NOD2-abhängige Immunantwort aus (Rosenstiel *et al.*, 2006; Viala *et al.*, 2004). Das cagPAI Gen kodiert für ein Typ IV Sekretionssystem, das für die Perforation der

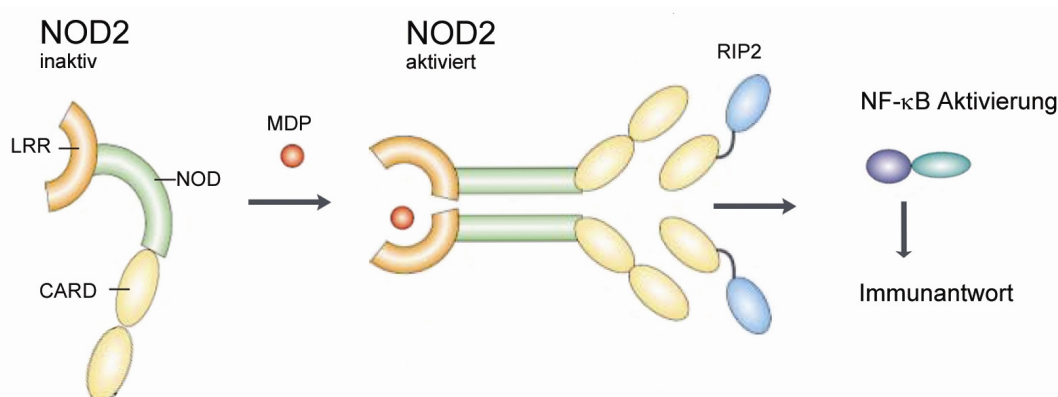
Zellmembran verantwortlich ist und durch dessen Aktivität die Peptidoglykan-Spaltprodukte detektiert werden können.

Momentan existiert wenig Wissen über die präzisen molekularen Mechanismen der NOD2-Signalgebung und der exakten strukturellen Eigenschaften des Moleküls. Erkenntnisse über die Funktionsweise von NOD2 lieferten systematische Mutagenesen und Trunkierungen (Tanabe *et al.*, 2004). Weiterhin konnten Rückschlüsse aus dem gut untersuchten Mechanismus der APAF-1-Aktivierung und -Signaltransduktion gezogen werden. Der NLR-Vertreter und Apoptose-Regulator APAF-1 (Abbildung 1-5) bindet Zytochrom-c über die Sensordomäne (WD40), was eine Konformationsänderung bewirkt. Infolgedessen oligomerisiert das Protein über homophile CARD-CARD-Interaktionen. In diesem als Apoptosom bezeichneten Multiproteinkomplex bindet die Procaspase-9 und wird durch die enge, sterisch günstige Position autoaktiviert, was auch als *induced proximity* bezeichnet wird. In einem weiteren Schritt werden Effektor-Procaspasen durch Proteolyse gespalten und aktiviert und somit die Apoptose vollständig initiiert (Boatright und Salvesen, 2003).



**Abbildung 1-5: Domänenstruktur von NOD2 und APAF-1.**

Die Domänenstruktur der NLR-Familienmitglieder NOD2 und APAF-1 im Vergleich. APAF-1: *apoptotic protease-activating factor-1*; CARD: *caspase activation and recruitment domain*; LRRs: *leucine-rich repeats*; NAD: *NACHT-associated domain*; NB-ARC: *nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, plant R gene products and CED-4 domain*; NOD: *nucleotide-binding and oligomerization domain*; WD-40, *WD-40 repeat*. Modifiziert nach (Schreiber *et al.*, 2005).

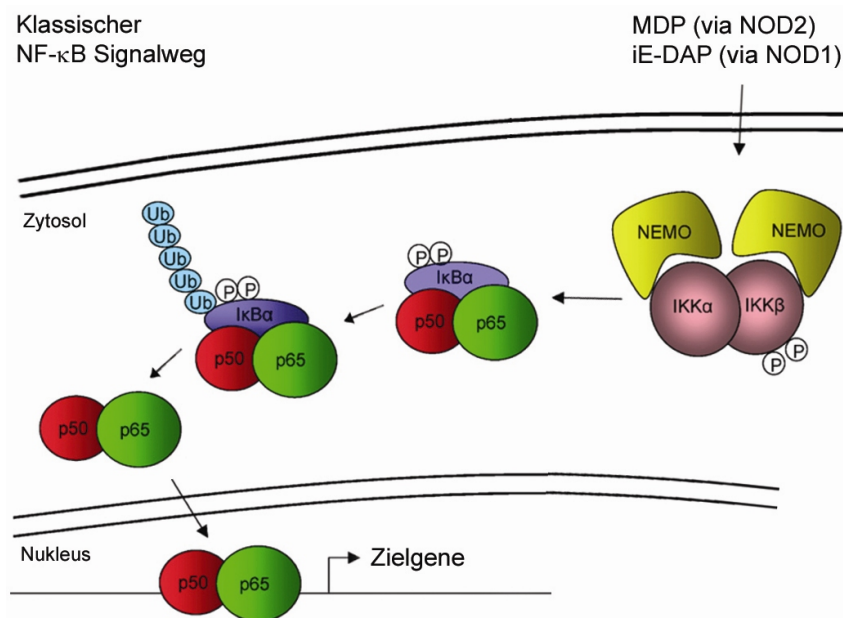


**Abbildung 1-6: Modell der NOD2-Signalgebung.**

Darstellung des NOD2-Moleküls, das nach MDP-Detektion oligomerisiert und über CARD-CARD-Interaktion RIP2 bindet. Über den NF-κB-Signalweg erfolgt die Immunantwort. Modifiziert nach (Inohara und Nunez, 2003).

Übertragen auf die Aktivierung und Signalgebung von NOD2 bewirkt die MDP-Detektion eine sterische Konformationsänderung der zuvor inhibierten NOD-Domäne, wobei bisher ungeklärt ist, ob die LRR-Domäne MDP direkt oder indirekt erkennt. Die freigelegte NOD-Domäne oligomerisiert und rekrutiert das Adaptermolekül RIP2, durch das die weitere Signalgebung über den NF- $\kappa$ B-Signalweg (siehe Abbildung 1-7) oder alternativ über die MAPK-Kaskade oder Caspase-1 initiiert wird (Kobayashi *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001b).

Stufenweise werden die Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalwegs aktiviert, beginnend mit der Phosphorylierung des I $\kappa$ B- (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) Kinase-Komplexes (IKK). Dieser setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*, IKK $\gamma$ ) und den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  zusammen. Aktiviertes IKK $\beta$  katalysiert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinresten 32 und 36 sowie die Ubiquitinylierung, die zur Degradation des Inhibitors im 26S-Proteasom führt. Die so freigesetzten p50/p65-Dimere translozieren in den Kern, wo sie an die NF- $\kappa$ B-DNA-Konsensussequenzen binden und die Transkription von pro-inflammatorischen Proteinen initiieren (Ghosh und Karin, 2002). Zu diesen gehören u.a. Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF), Chemokine (IL-8, RANTES, MIP-1a, MCP-1), Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin), weitere Enzyme (iNOX, COX-2, PLA-2) (Bonizzi und Karin, 2004) und antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelizidine) (Kaiser und Diamond, 2000; Voss *et al.*, 2006).



**Abbildung 1-7: Klassischer NF- $\kappa$ B-Signalweg.**

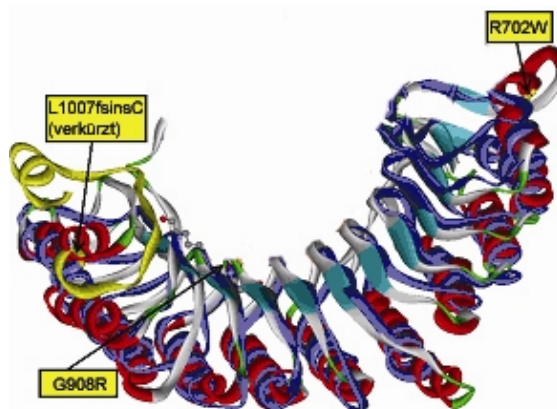
Darstellung der NLR-induzierten NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion. Die mit NEMO assoziierten Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  werden durch Phosphorylierung aktiviert und phosphorylieren ihrerseits I $\kappa$ B $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  wird daraufhin ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Das so freigesetzte NF- $\kappa$ B-p50/p65-Dimer wandert in den Zellkern und bindet an NF- $\kappa$ B-Konsensussequenzen, die die Transkription von Zielgenen der Immunantwort aktivieren. Modifiziert nach (Gloire *et al.*, 2006).



Die Identifikation der NOD2-Interaktionspartner TAK1 (Chen *et al.*, 2004), GRIM19 (Barnich *et al.*, 2005b), ERBIN (McDonald *et al.*, 2005), EMMPRIN (Kufer *et al.*, 2006; Till *et al.*, 2008), SGT1, Hsp90 (Mayor *et al.*, 2007) und Rac1 (Legrand-Poels *et al.*, 2007) verdeutlicht, dass die NOD2-Signalgebung durch eine Reihe positiver und negativer Modulatoren reguliert wird. Ebenfalls in den letzten Jahren erschienene Arbeiten wiesen NOD2-abhängig sezernierte antimikrobielle Peptide nach (Voss *et al.*, 2006). Sie sind neben den pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie dem Neutrophilen-Aktivator IL-8 wichtige Bestandteile der NOD2-induzierten Immunantwort.

### 1.1.3 Bedeutung von NOD2 für die intestinale Barriere

Im Jahr 2001 wurde eine genetische Assoziation von allelischen NOD2-Varianten mit Morbus Crohn nachgewiesen (Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a). Interessanterweise liegen die mit Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen (R702W, SNP8; G908R, SNP12 und L1007fsinsC, SNP13) alle direkt in oder in der nahen Umgebung der LRR-Domäne. Die beschriebenen Polymorphismen führen zu einem Austausch von Aminosäuren (SNP8, SNP12), oder einem verkürzten Protein (SNP13).



**Abbildung 1-8: Computergestützte dreidimensionale Darstellung der LRR-Domäne von NOD2.**

Die drei häufigsten mit Morbus Crohn assoziierten Mutationen in der LRR-Domäne sind eingezeichnet. Modifiziert nach (Albrecht *et al.*, 2003).

Die häufigste NOD2-Mutation bei Patienten mit Morbus Crohn ist die L1007fsinsC-Variante. Aktuell existieren einige Hinweise wie dieser Polymorphismus zur Pathogenese beiträgt. Durch die trunkierte LRR-Domäne wird MDP nicht erkannt, daraufhin kommt es zu keiner Oligomerisation und die Signaltransduktion über RIP2 und die nachfolgende NF- $\kappa$ B-Aktivierung bleiben aus (Girardin *et al.*, 2003b). Dies hat eine verminderte Zytokin- und Chemokin-Freisetzung zur Folge. Ebenfalls betroffen ist die Sekretion antimikrobieller Peptide. In HEK-293 Zellen führte die Überexpression der SNP13-Variante zur verminderten Sekretion des humanen  $\beta$ -Defensins hBD-2 (Voss *et al.*, 2006). Auch bei Morbus Crohn-Patienten ist die Expression von Defensinen bei Trägern der SNP13-Mutation gegenüber den Wildtyp-Trägern signifikant vermindert (Wehkamp *et al.*, 2004). Letztlich könnte eine verminderte Sekretion antimikrobieller Peptide die intestinale Mikroflora beeinflussen.

### 1.1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

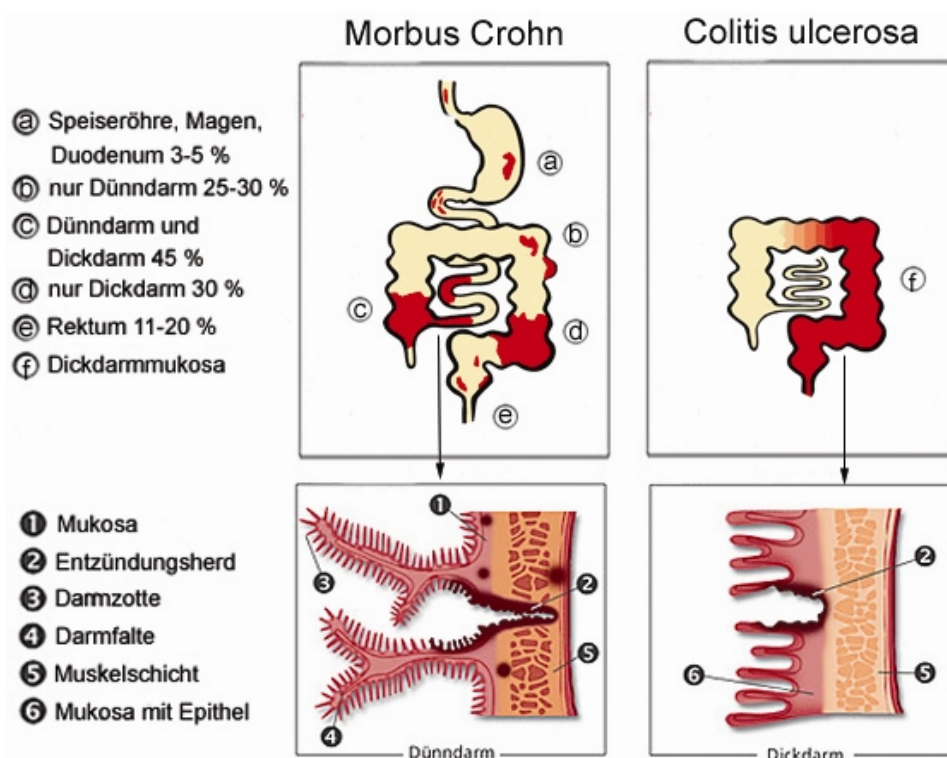
Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die beiden Hauptformen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED). In Deutschland wird die Anzahl der Betroffenen auf ca. 300.000 geschätzt. Epidemiologische Studien zeigen seit den 60er Jahren eine steigende Anzahl Neuerkrankter, vor allem in westlichen industrialisierten Ländern. Häufig manifestiert sich die Erkrankung zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr (Jacobsen *et al.*, 2006; Podolsky, 2002).

**Tabelle 1-2: Epidemiologische Daten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.**

Modifiziert nach (Jacobsen *et al.*, 2006; Podolsky, 2002).

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Prävalenz (pro 100.000)	150	200
Inzidenz (pro 100.000)	4-7	9-12
Verhältnis ♂:♀	1,8:1	1 :1

Beide Formen sind gekennzeichnet durch den Verlust der intestinalen Barriere und einer verminderten (Nährstoff-) Resorption. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterscheiden sich in einer Reihe klinischer und pathologischer Merkmale:



**Abbildung 1-9: Manifestationsorte chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.**

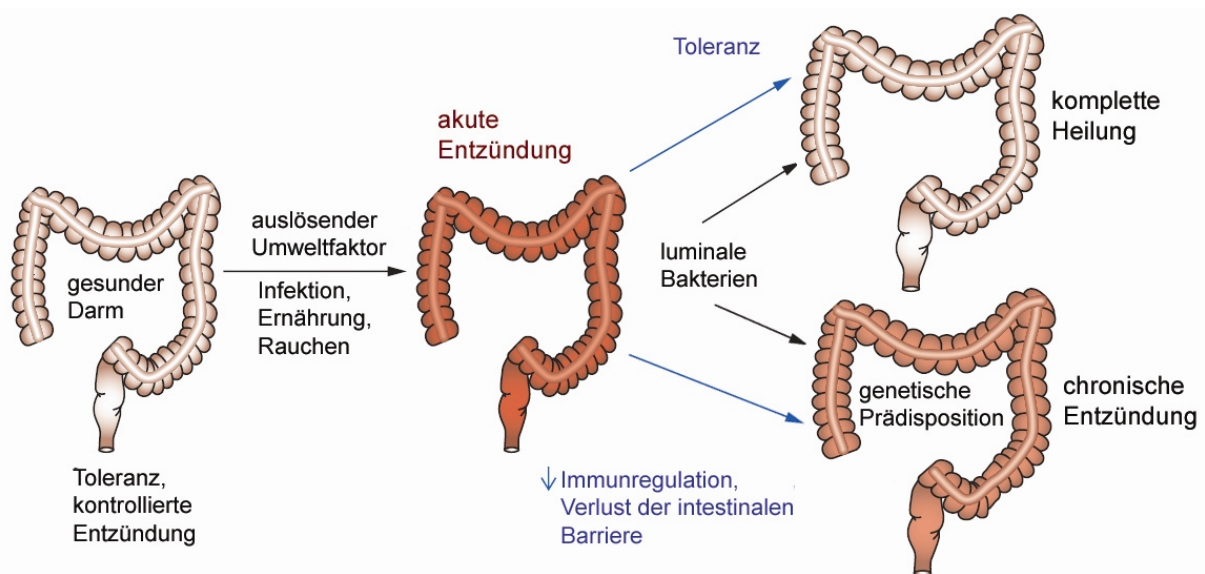
Manifestation von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltrakts und der Mukosa. Modifiziert nach (www.internisten-im-netz.de, 2008; www.kompetenznetz-ced.de, 2008).



Morbus Crohn betrifft den gesamten Gastrointestinaltrakt. Die Entzündung kann sich bis in die Muskelschicht der Darmwand erstrecken. Zu den typischen Symptomen gehören Diarrhöen und Gewichtsverlust. Weitere Kennzeichen sind Aphthen, Granulome und Fisteln. Bei Colitis ulcerosa ist die Entzündung auf die Kolonmukosa begrenzt. Zu den Symptomen gehören ebenfalls Diarrhöen sowie rektale Blutungen. Es kann zu Ulzerationen und Kystenabszessen kommen; das Krebsrisiko ist erhöht (Hendrickson *et al.*, 2002; Jewell, 1998).

Die Ursache chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute nicht vollständig geklärt, viele Daten deuten jedoch auf eine multifaktorielle Pathogenese hin. Neben dem genetischen Einfluss (siehe Kapitel 1.1.3) werden Umweltfaktoren wie Ernährungs- und Lebensstil, Rauchen und Infektionen (Loftus, 2004) diskutiert.

Eine akute Darmentzündung könnte so bei einer genetisch prädisponierten Person zu einem fehlregulierten intestinalen Immunsystem führen und die Manifestation einer chronischen Entzündung zur Folge haben (siehe Abbildung 1-10).



**Abbildung 1-10: Pathogenese von CED bei genetischer Prädisposition.**

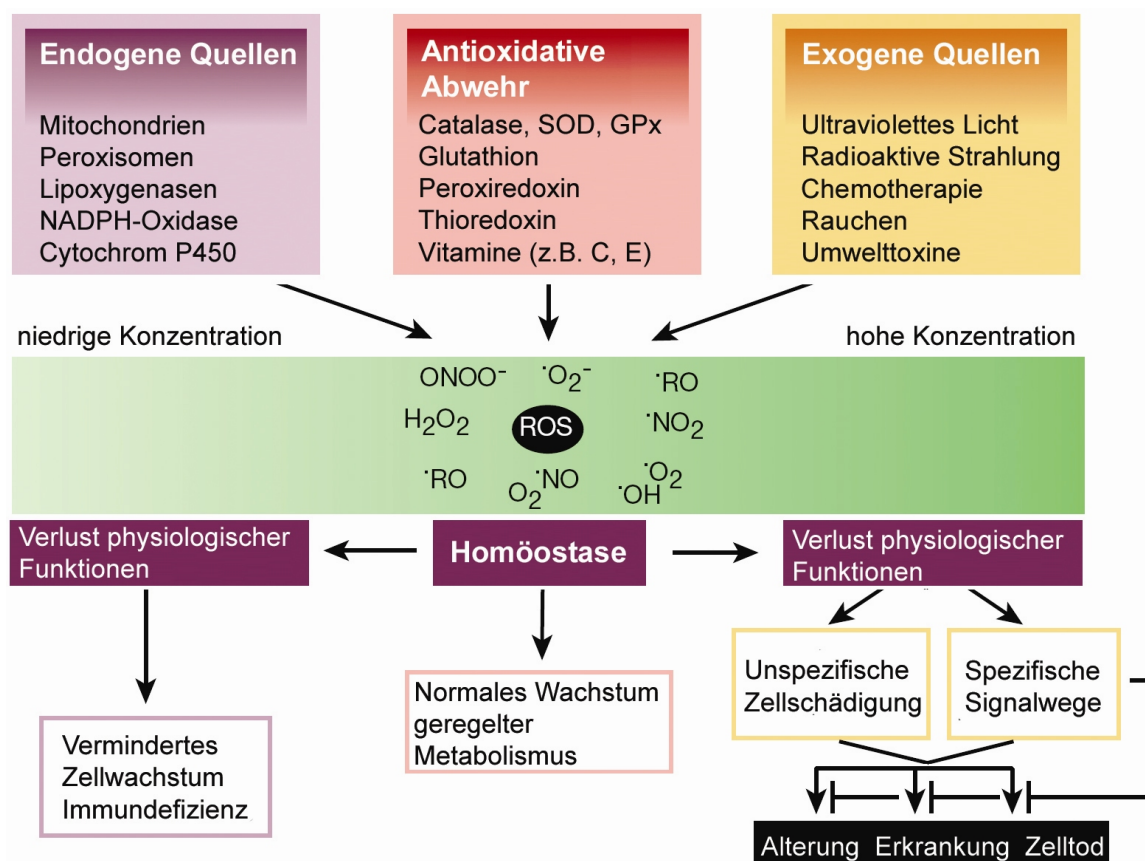
Modifiziert nach (Sartor, 2006).

Durch den Verlust der intestinalen Barriere dringen Pathogene in die Epithelzellen sowie darunter liegende Gewebe ein. Die hervorgerufene Entzündungsreaktion ist mit der Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies, dem oxidativen Stress assoziiert (Halliwell und Gutteridge, 1984).

## 1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Der Terminus „reaktive Sauerstoffspezies“ (*reactive oxygen species*, ROS) ist ein Sammelbegriff. Er umfasst das Superoxid- ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Hydroxyl- ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), Peroxyl- ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ), Alkoxyl- ( $\text{RO}_2$ ) und Hydroperoxyl- ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) Radikal und nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ), Ozon ( $\text{O}_3$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Reaktive Sauerstoffspezies sind zusammen mit reaktiven Stickstoffspezies (RNS) an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Beispiele für ROS-abhängig katalysierte Reaktionen sind der „respiratorische *burst*“ der Phagozyten (Babior *et al.*, 1973), die Iodierung des Thyreoglobulins in der Schilddrüse (Igo *et al.*, 1964) und die Freisetzung von spermizidem Wasserstoffperoxid durch die befruchtete weibliche Eizelle (Foerder *et al.*, 1978).

Unter physiologischen Bedingungen herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen ROS generierenden und neutralisierenden Reaktionen. Diese Redoxhomöostase basiert auf einem fein regulierten Netzwerk enzymatischer und nicht-enzymatischer Antioxidantien.



**Abbildung 1-11: Darstellung von ROS und ihren Wirkungen auf die Zelle.**

Endogene und exogene Quellen sind an der Entstehung von ROS und RNS beteiligt. Ein Netzwerk antioxidativer Enzyme und Verbindungen sorgt für ein physiologisches Redox-Gleichgewicht. Ist dies zugunsten anti- oder prooxidativer Prozesse verschoben, können pathologische Veränderungen die Folge sein. Modifiziert nach (Finkel und Holbrook, 2000).

### 1.2.1 ROS als intrazelluläre Botenstoffe

Mehrere Eigenschaften erklären die herausragende Rolle von ROS als sekundäre Botenstoffe: Sie sind kleine, diffusionsfähige, ubiquitäre Moleküle, die lokal begrenzt schnell synthetisiert und degradiert werden können (Rhee, 1999).

Sie werden nach Stimulation mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen (z.B. TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, PDGF, EGF, VEGF und Insulin) induziert und sind an dem Ionen-transport, der Neuromodulation, Apoptose und Transkription beteiligt (Rhee *et al.*, 2000; Lander, 1997). Dabei wirken ROS auf molekulare Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalwegs sowie den MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38, AP-1 (*activator protein-1*), PLC- $\gamma$ 1 (*phospholipase C- $\gamma$ 1*), PKC (*protein kinase C*) sowie p53, JAK/STAT (*janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) und PI3K/AKT (*phosphoinositide 3-kinase*) (Martindale und Holbrook, 2002). Die beiden zentralen Mediatoren sind hierbei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, das ebenfalls schnell zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutiert. Generiert werden sie unter anderem in der mitochondrialen Atmungskette und in Peroxisomen, sowie enzymatisch von NADPH-Oxidasen, Lipoxxygenasen und Cyclooxygenasen (Bubici *et al.*, 2006).

Eine entscheidende Rolle bei der ROS-vermittelten Signaltransduktion spielt ihre lokale Konzentration. Geringe Konzentrationen induzieren über den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf-2 (*NF-E2-related factor-2*) die Transkription antioxidativer Enzyme, während hohe Konzentrationen in Form von oxidativem Stress zur Apoptose oder Nekrose führen. Intermediäre ROS-Konzentrationen induzieren über NF- $\kappa$ B (siehe Abbildung 1-7) und AP-1 eine Immunantwort (Tonks, 2005).

Ein Mechanismus der ROS-vermittelten Signalgebung ist die oxidative Modifikation von Proteinen, wie die Protein-Dimerisierung durch Bildung intra- oder intermolekularer Disulfidbrücken, die Proteinquervernetzung durch Peroxidase- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-katalysierte Dityrosin-Bildung sowie die Oxidation von Eisen- oder Kupferhaltigen Proteinen durch die Fenton-Reaktion. Ein weiterer, indirekter Mechanismus der ROS-vermittelten Signalgebung ist die Veränderung des intrazellulären Redoxstatus, also des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion oder Thioredoxin (Thannickal und Fanburg, 2000).

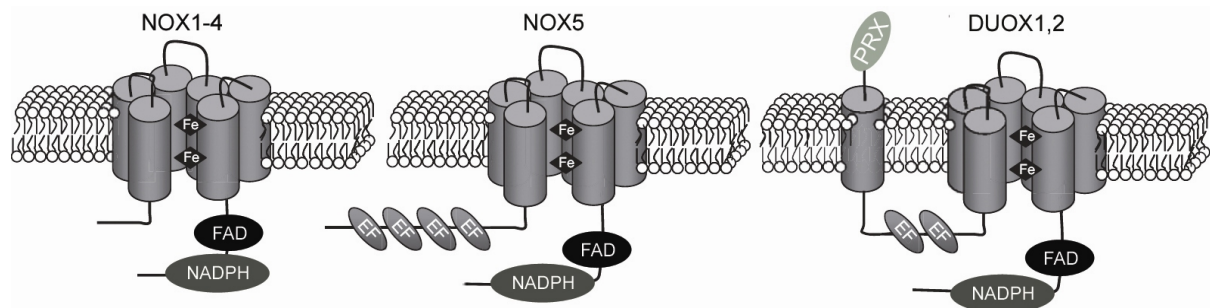
### ROS und NF- $\kappa$ B-Signalgebung

Hinsichtlich der Rolle von ROS bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigt die Literatur kein einheitliches Bild. Die Mechanismen und das Maß der Redox-Regulation variieren je nach Kontext und Zelllinie. Bisher gezeigt wurde, dass die Zugabe von Antioxidantien wie NAC (*N*-Acetyl-L-Cystein) oder der Vitamine C und E zelltyp- und stimulusabhängig die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS, TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  hemmt (Bubici *et al.*, 2006). Ebenso wird die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Überexpression antioxidativer Enzyme (Catalase, Glutathionperoxidase, Thioredoxinperoxidase) vermindert (Gloire *et al.*, 2006).

Aktuell sind verschiedene Mechanismen der ROS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beschrieben: In HeLa-Zellen induziert  $H_2O_2$  die Aktivierung der Proteinkinase D, die wiederum den IKK-Komplex phosphoryliert und somit NF- $\kappa$ B aktiviert (Storz und Toker, 2003). In murinen T-Lymphozyten und humanen Jurkat-Zellen induziert  $H_2O_2$  über weitere Signalmediatoren die Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  am Tyrosinrest 42, wodurch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung eingeleitet wird (Schoonbroodt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2003). Allgemein wird heute angenommen, dass die Wirkung von ROS auf die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion im Wesentlichen auf der Aktivierung von IKK beruht. Allerdings vermitteln und beeinflussen – je nach Zelltyp – unterschiedliche redoxensitive Signalwege diese Aktivierung.

### 1.2.2 Die Familie der NADPH-Oxidasen (NOX)

Die NOX-Familie der NADPH-Oxidasen sind Proteine, die Elektronen über biologische Membranen transportieren und dabei Sauerstoff zu Superoxid reduzieren. Bereits 1978 wurde die Cytochrom-b-Untereinheit der phagozytären NADPH-Oxidase als funktionelle Komponente des „oxidative burst“ beschrieben (Segal *et al.*, 1978). Somit wurde deutlich, dass ROS nicht nur als metabolisches Beiprodukt (wie z.B. in den Mitochondrien) auftreten, sondern als primäre Funktion von Enzymsysteme gezielt synthetisiert werden. In den letzten Jahren wurden sechs Homologe der Phagozyten Cytochrom-b-Untereinheit (gp91<sup>phox</sup>/NOX2) identifiziert: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 sowie die dualen Oxidasen DUOX1 und DUOX2 (De Deken *et al.*, 2000; Dupuy *et al.*, 1999; Lambeth *et al.*, 2000).

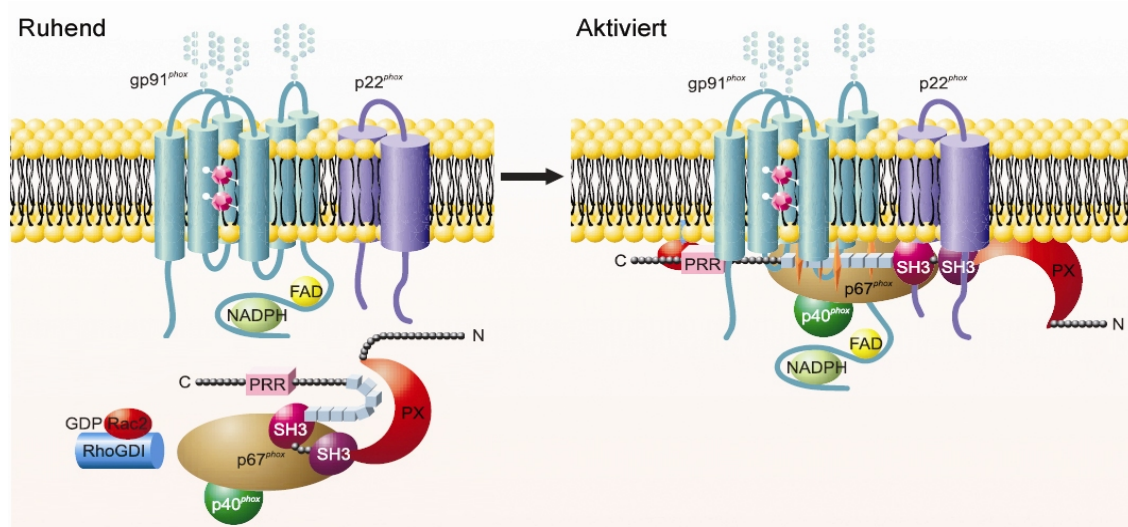


**Abbildung 1-12: Domänenstruktur von NOX-Familienmitgliedern.**

Konservierte Struktur der NADPH-Oxidasen mit NADPH- und FAD-Bindestelle, sechs Transmembran-Domänen und vier Häm-Bindestellen. NOX5, DUOX1 und 2 verfügen über  $Ca^{2+}$ -Bindestellen. DUOX1 und DUOX2 besitzen eine zusätzliche Peroxidase-Domäne. Modifiziert nach (Bedard *et al.*, 2007).

Bis heute liegen keine kristallografischen Daten zur Proteinstruktur vor. Nach computergestützten Vorhersagen ist davon auszugehen, dass alle Familienmitglieder Transmembranproteine sind, denen vier konservierte Strukturen gemeinsam sind. Ausgehend vom carboxyterminalen Ende sind dies: eine NADPH-Bindestelle, eine FAD-Binderegion, sechs konservierte Transmembran-Domänen und vier Häm-bindende Histidine, zwei im Bereich der dritten und zwei im Bereich der fünften Transmembran-Domäne (Lambeth *et al.*, 2000; Lambeth, 2002).

Zusätzlich verfügen NOX5, DUOX1 und DUOX2 über Kalzium-bindende EF-Motive. Eine weitere Transmembran-Domäne sowie eine Peroxidase-Domäne liegen außerdem bei DUOX1 und DUOX2 vor (Banfi *et al.*, 2001; Edens *et al.*, 2001).

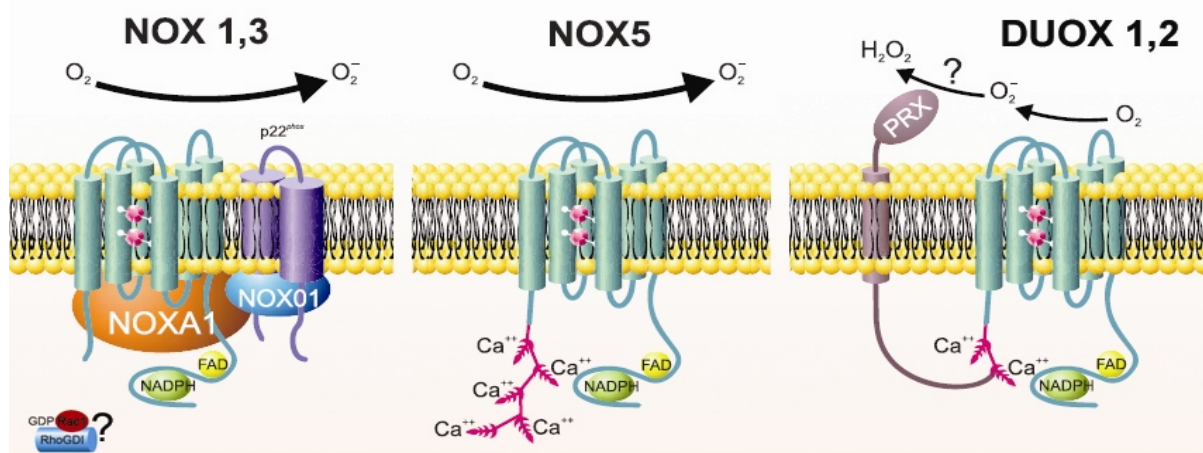


**Abbildung 1-13: Aufbau und Aktivierung der Phagozyten NADPH-Oxidase.**

In ruhenden Phagozyten ist das Heterodimer NOX2/gp91<sup>phox</sup>-p22<sup>phox</sup> in der Membran lokalisiert, der Komplex aus p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup>, sowie die GTPase Rac2 im Zytosol. Zur Aktivierung der NADPH-Oxidase translozieren sie an die Membran. Modifiziert nach (Nauseef, 2008).

Das Wissen über den Aufbau und die Aktivierung der NADPH-Oxidasen leitet sich von dem gut untersuchten Familienmitglied NOX2 ab. Das Transmembranprotein liegt zusammen mit der p22<sup>phox</sup>-Untereinheit als Heterodimer an der Plasmamembran ruhender Phagozyten vor. P22<sup>phox</sup> stabilisiert den Komplex in der Membran und ermöglicht die Bindung von weiteren Untereinheiten. In den Neutrophilen von Granulomatose-Patienten mit einem genetischen Defekt der NOX2/gp91<sup>phox</sup> oder der p22<sup>phox</sup> Untereinheit sind beide Proteine nicht nachweisbar. Dies verdeutlicht den Stellenwert ihrer Interaktion zur Bildung einer stabilen, aktiven Oxidase (Heyworth *et al.*, 2003). Im Zytosol befinden sich die regulatorischen Proteine p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup> und die GTPase Rac2. Eine komplexe Serie von Protein/Protein-Interaktionen aktiviert NOX2: Agonisten lösen die Phosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne von p47<sup>phox</sup> aus (in der Abbildung 1-13 dargestellt durch aneinander gereihte kleine Boxen). Die ausgelöste Konformationsänderung legt die PX- (Phosphoinositid-bindende) Domäne, SH3- (Src-Homologie-3) Domäne und PRR- (Prolin-reiche Regionen) Domäne innerhalb des Moleküls frei und vermittelt die Assoziation mit der Membran. Die GTPase Rac2 interagiert initial mit NOX2, in einem weiteren Schritt mit p67<sup>phox</sup> (Nauseef, 2008). In dem assemblierten aktiven Enzym wird ein Elektron stufenweise von NADPH auf FAD, weiter über das proximale Häm zu dem distalen Häm und schließlich auf molekularen Sauerstoff transferiert. Das entstehende Superoxid-Anion dismutiert spontan oder über die SOD zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cross *et al.*, 1995).





**Abbildung 1-14: Strukturelle Organisation von NOX-Familienmitgliedern.**

Unterschiedliche Kofaktoren und regulatorische Proteine sind an der Aktivierung der NOX-Familienmitglieder beteiligt. Modifiziert nach (Nauseef, 2008).

Homologe der  $p47^{\text{phox}}$  und  $p67^{\text{phox}}$  Proteine NOXO1 (NOX Organisator) und NOXA1 (NOX Aktivator) sind an der Aktivierung von NOX1 und NOX3 beteiligt, wobei das humane NOX3 ohne NOXA1 aktiviert wird (Cheng *et al.*, 2004). Während Rac1 zur Aktivierung von NOX1 führt und keine Rolle für NOX5 und DUOX1/2 spielt, existieren widersprüchliche Daten hinsichtlich seiner Rolle für die NOX3- und NOX4-Aktivierung. NOX4 ist ebenfalls mit  $p22^{\text{phox}}$  assoziiert (Ambasta *et al.*, 2004) und konstitutiv aktiv (Geiszt *et al.*, 2000).

DUOX1 und DUOX2 sind NADPH- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige NOX Familienmitglieder. Sie werden posttranslational durch ER-ständige Proteine glykosyliert. Koexpressionstudien zeigten, dass diese Modifikationen essentiell für die weitere Prozessierung und Reifung im Golgi-Apparat und die Translokation zur Plasmamembran sind. Entsprechend ihrer Funktion werden diese Proteine als DUOX-Aktivator1 oder -2 (DUOXA1, DUOXA2) bezeichnet (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005; Grasberger und Refetoff, 2006). Bisher ist ungeklärt, ob die Peroxidase-ähnliche Domäne tatsächlich als Peroxidase fungiert, da essentielle Aminosäuren nicht konserviert sind (Colas und Ortiz de Montellano, 2003; Daiyasu und Toh, 2000). Edens und Kollegen stellten jedoch eine Peroxidase-Aktivität bei rekombinantem Protein fest (Edens *et al.*, 2001). Die Rolle von  $p22^{\text{phox}}$  ist ebenfalls nicht vollständig geklärt. Eine Interaktion zwischen DUOX2 und  $p22^{\text{phox}}$  wurde mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen, hatte aber keine Bedeutung für die Aktivierung des Enzyms (Lee *et al.*, 2007).

**Tabelle 1-3: Expression von NADPH-Oxidase-Familienmitgliedern.**

NOX Enzym	weitere Namen	Gewebe	
		Hohe Expression	Mittlere bis niedrige Expression
NOX1	NOH-1, MOX1, GP91-2	Kolon	glatte Muskulatur, Endothel, Uterus, Plazenta, Prostata, Osteoklasten
NOX2	CYBB, gp91 <sup>phox</sup>	Phagozyten	B-Lymphozyten, Neurone, Kardiomyozyten, Skelettmuskulatur, Hepatozyten, Endothel
NOX3	GP91-3	Innenohr	fötale Niere, fötale Milz, Gehirn
NOX4	RENOX, KOX-1, KOX	Niere, Blutgefäße	Osteoklasten, Endothel, glatte Muskulatur, hämatopoetische Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Neurone
NOX5		Lymphgewebe, Testis	Endothel, glatte Muskulatur, Pankreas, Plazenta, Uterus, Magen
DUOX1	THOX1, LNOX1, NOXEF1	Schilddrüse	Atemwegsepithel, Zungenepithel, Zerebellum, Testis
DUOX2	THOX2, LNOX2, NOXEF2	Schilddrüse	gastrointestinales Epithel, Speichel- und rektale Drüsen, Atemwegsepithel, Uterus, Gallenblase, Langerhans'sche Inseln

### 1.2.3 Interaktionen zwischen NOX-Enzymen und Toll-like-Rezeptoren

Aktuelle Studien demonstrieren einen Zusammenhang zwischen der NOX-vermittelten ROS-Produktion und der Immunsignalgebung durch Toll-like-Rezeptoren (Asehnoune *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004). So führt eine Vorbehandlung von Phagozyten mit Antioxidantien zu einer erniedrigten LPS-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Zytokin-Freisetzung und spricht für eine von ROS beeinflusste TLR4-Signalgebung (Asehnoune *et al.*, 2004). Interessanterweise wurde in Epithelzellen (HEK-293) eine direkte Interaktion von TLR4 und NOX4 nachgewiesen, die essentiell für die LPS-induzierte ROS-Bildung ist (Asehnoune *et al.*, 2004). Kawahara und Kollegen zeigten, dass die NOX-Aktivierung durch die TLR Signalgebung spezifisch ist. In epithelialen Magenzellen induziert LPS, das von *Helicobacter pylori* stammt, die ROS-Bildung, indem die TLR4-Signalgebung NOX1 aktiviert. Andererseits ist im Kolon die TLR5-Signalgebung, ausgelöst durch Flagellin von *Salmonella enteridis*, der hauptsächliche NOX1-Aktivator (Kawahara *et al.*, 2004b; Kawahara *et al.*, 2001). Rokutan *et al.* schlugen in diesem Zusammenhang vor, dass die spezifische Aktivierung von NOX1 durch Immunrezeptoren des angeborenen intestinalen Immunsystems eine Rolle für die epitheliale Barrierefunktion spielt. Auf der anderen Seite deutet die Hochregulation der NADPH-Oxidase in Adenomkarzinomzellen auf eine mögliche Beteiligung an der Tumorprogression und Kanzerogenese hin (Rokutan *et al.*, 2006).

### 1.3 Zielsetzungen

In dieser Arbeit wurde die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für die NOD2-abhängige Signaltransduktion untersucht.

**NOD2** ist ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems. Er detektiert im Zytosol der Zelle den bakteriellen Zellwandbestandteil Muramyl-dipeptid (MDP). Aktiviertes NOD2 initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade, die in einer pro-inflammatorischen Immunantwort mündet. Die intakte Funktion des NOD2-Rezeptors ist ein entscheidender immunologischer Faktor der intestinalen Barriere. Ein genetischer Defekt von NOD2 ist mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert.

Seit langem ist die Beteiligung **reaktiver Sauerstoffspezies** an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen bekannt. In Form von „oxidativem Stress“ schädigen sie durch unspezifische Lipid- und Proteinoxidationen Zellen und Gewebe.

In den vergangenen Jahren wurde dagegen der Einfluss von ROS auf *physiologische* Funktionen näher charakterisiert: Sie agieren in einer Reihe von Signalkaskaden als intrazelluläre Botenstoffe und modulieren so eine Vielzahl zellulärer Prozesse.

Richtungweisend für das Thema dieser Arbeit waren die Interaktion ROS-generierender Enzyme mit den Toll-*like*-Rezeptoren und die Gemeinsamkeit von NOD-*like*-Rezeptoren mit einer Familie pflanzlicher Pathogen-Resistenz (R-) Genen.

In Analogie hierzu wurde die Rolle von ROS für die NOD2-vermittelte Signalgebung anhand folgender Fragen untersucht:

1. Werden ROS durch die MDP-vermittelte NOD2-Signalgebung in intestinalen Epithelzellen gebildet?
2. Welche Rolle spielt hierbei die Familie der NADPH-Oxidasen (NOX)?
3. Welche funktionellen Konsequenzen hat die NOD2-vermittelte ROS-Produktion?
  - a. Inwiefern wird durch sie die NOD2-Signalgebung moduliert?
  - b. Inwiefern ist sie an der intestinalen Barrierefunktion beteiligt?



## 2 Material und Methoden

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer, sowie die Puffer- und Medienzusammensetzungen finden sich im Anhang.

### 2.1 Zellbiologische Methoden

Während aller Arbeiten mit Zellkulturen wurde auf sterile Bedingungen geachtet und ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden an einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) durchgeführt.

#### 2.1.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Krebszelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in Nährmedium bei 37 °C und 5 % (v/v) Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) kultiviert.

**Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien.**

Zelllinie (DSMZ Nr.)	Zelltyp	Eigenschaften	Kulturmedium
Caco-2 (ACC 169)	human colon adenocarcinoma	adhärent, epithelial	MEM + 20 % FCS
HEK-293 (ACC 305)	human embryonal kidney	adhärent, epithelial	DMEM + 10 % FCS
HeLa (ACC57)	human cervix carcinoma	adhärent, epithelial	RPMI + 10 % FCS
HT-29 (ACC299)	human colon adenocarcinoma	adhärent, epithelial	DMEM + 10 % FCS
SW-480 (ACC 313)	human colon adenocarcinoma	adhärent, endothelial	RPMI + 10 % FCS

Die Konfluenz und Morphologie der Zellkultur wurde zweimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) visuell überprüft. Bei 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die adhärenenten Zellen mit erwärmten PBS (Gibco, Eggenstein) gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Die Zellsuspensionen wurde in 50 ml-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) überführt und für 5 min bei 1.700 U/min in einer Zentrifuge (Varifuge 3.0R, Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold) pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und ein entsprechender Anteil in 25 ml-Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg) überführt (durchschnittliche Verdünnung 1:4 - 1:6) oder direkt in definierter Zelldichte für das entsprechende Experiment ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage verwendet und einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

### 2.1.2 Isolierung primärer muriner Kolonepithelzellen

Für die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies wurden murine intestinale Epithelzellen aus dem Kolon von Wildtyp- und NOD2-*knockout*-Mäusen isoliert. Hierzu wurde nach Entnahme des Darms das Gewebe zweimal mit PBS gespült und in 10 ml HBSS + 1,5 mM EDTA (ohne Ca, Mg) für 10 Minuten bei 37 °C leicht geschüttelt. Der Überstand wurde in ein 15 -ml-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Das überbleibende Gewebe wurde in 3 ml PBS aufgenommen, kurz gevortext, der Überstand mit dem vorherigen Überstand vereinigt und 1 Minute bei 1000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und zur anschließenden Kultivierung in Medium überführt.

### 2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde unter Verwendung von Trypan-Blau (Sigma, München) und einer Neubauer-Zählkammer (VWR International, Darmstadt) bestimmt. Trypan-Blau ist ein Azofarbstoff, der selektiv tote Zellen färbt und zur Zell-Vitalitätsbestimmung eingesetzt wird.

Ein Aliquot von 10 µl der Zellsuspension wurde mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung (0,4 %), versetzt und 10 µl dieser Verdünnung in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 10.000$$

### 2.1.4 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mit dem MTT-Assay der Firma Promega (Heidelberg) bestimmt. Das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in den Mitochondrien lebender Zellen zu purpurfarbenem Formazan umgesetzt, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm messbar ist. Da die Farbintensität proportional zur enzymatischen Reduktion von MTT ist, kann somit die Zellviabilität kolorimetrisch quantifiziert werden.

Der Assay wurde im 96-*well*-Platten-Format nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Absorptionsmessung bei 570 nm wurde das Platten-Lesegerät GeniosPro der Tecan Trading AG (Schweiz) und ein entsprechender Filtersatz verwendet.

### 2.1.5 Aussaat und Ernte der Zellen

Die verwendeten Zellkulturformate mit entsprechender Zellzahl und Medienvolumen sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

**Tabelle 2-2: Verwendete Zellkulturformate.**

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Medienvolumen [ml]
Proteinisolierung	10-cm-Schale	$5 \times 10^6$	10
Immunpräzipitation	10-cm-Schale	$2 \times 10^6$	10
RNA-Isolierung	6-well-Platte	$4 \times 10^5$	2
FACS-Messung	6-well-Platte	$4 \times 10^5$	2
Fluoreszenzmikroskopie	6-well-Platte	$2 \times 10^5$	2
Gentamicin-Protection Assay	24-well-Platte	$2 \times 10^4$	0,5
ROS-Messung (cDCF Assay)	96-well-Platte	$2 \times 10^4$	0,1
Reportergenassay	96-well-Platte	$2 \times 10^4$	0,1
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	96-well-Platte	$2 \times 10^4$	0,1

Die Zellen wurden wie in 2.1.1 beschrieben ausgesät. Zur Ernte wurde die Zellkulturplatte auf Eis überführt, mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1.200–1.800 U/min (Varifuge 3.0R von Heraeus, Hanau) sedimentiert. Danach wurden die Zellpellets entweder in den entsprechenden Puffern aufgenommen oder bei -80 °C eingefroren.

### 2.1.6 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das erfolgreiche Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen ist u.a. von der Konfluenz der Zellen abhängig. Die Zellen wurden daher bei einer Konfluenz zwischen 50-80 % transfiziert.

#### Transfektion von Plasmid-DNA

Fremd-DNA wurde mittels Lipofektion in eukaryotische Zellen eingebracht. Hierbei wird die negativ geladene DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel komplexiert und durch Fusion der Vesikel mit der Zellmembran in die Wirtszelle transferiert. Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA wurde Lipofectamine™ LTX (Invitrogen, Karlsruhe) für Caco-2 Zellen und für alle anderen Zelllinien FuGENE® 6 (Roche, Mannheim) verwendet.

Zunächst wurde die Plasmid-DNA in FCS-freiem Medium verdünnt, das Transfektions-Reagenz zugefügt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend zu dem Zellkulturmedium in den jeweiligen Kulturschalen hinzugegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tabelle 2-3: Verwendete Formate und Volumina für DNA-Transfektionsansätze.**

Plattenformat	Medium [µl]	DNA [µg]	Lipofectamine™ LTX [µl/well]	FuGENE® 6 [µl/well]
10-cm-Schale	500	4	8	12
6-well-Platte	100	1	4	3
24-well-Platte	75	0,5	1	1
96-well-Platte	50	0,05	0,2	0,15

### Transfektion von siRNA

Für die transiente Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen wurde das Polyamin-basierte Reagenz siPORT™ Amine (Ambion, Austin, USA) verwendet.

Ein Aliquot FCS-freien Zellkulturmediums wurde zunächst mit siPORT™ Amine, ein weiteres mit siRNA vermischt (siehe Tabelle 2-4) und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vereint und nach zehnminütiger Inkubation zu den Zellen hinzupipettiert.

**Tabelle 2-4: Verwendete Formate und Volumina für siRNA-Transfektion.**

Plattenformat	Plattengesamt-volumen [ml]	siRNA [µmol] pro Medienvolumen	siPORT™ Amine [µl] pro Medienvolumen
6-well-Platte	2	7,5/100 µl	5/100 µl
12-well-Platte	1	3/50 µl	3/50 µl
24-well-Platte	0,5	1,5/25 µl	1,5/25 µl
96-well-Platte	0,1	0,3/10 µl	0,3/10 µl

### 2.1.7 Zellinvasions-Assays

Der Einfluss von NADPH-Oxidase-Enzymen und NOD2 auf die Zellinvasion von *Listeria monocytogenes* wurde mit dem Gentamicin-Protection-Assay und durch FACS-Analyse mittels CFSE-Markierung (5-(6)-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) untersucht.

Hierzu wurde die Spezies *Listeria monocytogenes*, Serotyp 1/2a, Stamm EGD verwendet. Diese Gram-positiven, stäbchenförmigen, fakultativ-anaeroben Bakterien können in nicht-phagozytierende Zellen eindringen und eine Erkrankung verursachen, die als Listeriose bezeichnet wird.

**Gentamicin-Protection Assay (GPA)**

Die Listerien wurden zunächst in 5 ml Luria-Broth (LB)-Medium über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension mit LB-Medium 1:5 verdünnt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase (ca. 2-3 Stunden) expandiert. Bei einer OD von 0,2 bei 600 nm, die einer Bakteriendichte von  $\sim 2 \times 10^8$  Kolonie-formenden Einheiten (CFU, *colony-forming units*) pro ml entspricht, wurden die Zellen abzentrifugiert (3000x g, 10 min, RT) und in einem entsprechenden Volumen DMEM aufgenommen. Caco-2 oder HEK-293 Zellen wurden 4 Stunden vor Bakterienzugabe in FCS- und antibiotikafreiem Medium kultiviert und anschließend mit MOI=100 (MOI, *multiplicity of infection*), also mit 100 Listerien pro Zelle, infiziert. Nach einstündiger Infektionszeit wurde die Bakteriensuspension gegen Gentamicin-haltiges Medium (50 µg/ml) ausgetauscht, was zum Absterben der extrazellulären Bakterien führt. Zur Negativkontrolle wurden Listerien in Abwesenheit von HEK-293 Zellen mit dem Gentamicin-haltigen Zellkulturmedium inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Detergenz-haltigem PBS (10 % Triton-X100) lysiert. Das Lysat wurde auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt und die relative CFU im Vergleich zu der CFU unbehandelter Zellen berechnet.

**FACS-Analyse mittels CFSE-Markierung**

Eine Listerienkultur wurde wie beschrieben angesetzt und bei einer OD von 0,2 bei 600 nm mit CFSE 1:500 verdünnt. Die Bakterien wurden im Dunkeln für 45-60 min bei 37 °C mit dem Farbstoff inkubiert, anschließend abzentrifugiert (3000 U/min, 10 min), mit PBS gewaschen, wiederholt abzentrifugiert und in 5 ml Medium resuspendiert. In jede Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte wurden 200 µl Bakteriensuspension (MOI=100) hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die extrazellulären Bakterien mit PBS abgewaschen, die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Alle Experimente wurden als Duplikate durchgeführt, unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Proben wurden mit Hilfe des FACS-Calibur Durchflussszytometers (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt und im Fluoreszenzkanal-1 bei 530 nm detektiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil der CFSE-positiven Zellen (M1) sowie das geometrische Mittel (*geo mean*) der Fluoreszenzintensität bestimmt. Um die Menge an internalisierten Listerien abschätzen zu können, wurde der Aufnahmeindex (u.i., *uptake index*) als Produkt von M1 und *geo mean* errechnet.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um Plasmide und lineare DNA-Fragmente ab einer Größe von 200 bp zu trennen und zu identifizieren. In Abhängigkeit von der Agarosekonzentration im Gel [0,5 bis 2,0 % (w/v)] werden die DNA-Fragmente von 200-50.000 bp entsprechend ihrer Größe und Gestalt aufgetrennt (Gelsiebeeffect). Die DNA-Proben wurden mit zehnfachem Auftragspuffer versetzt, zusammen mit einem Marker in die Taschen des ethidiumbromidhaltigen Gels aufgetragen und bei konstanter Spannung von 90 Volt 20-60 min aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert im UV-Licht bei 312 nm. Die DNA wurde für qualitative und quantitative Analysen mittels einer UV-Geldokumentationsanlage (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen) dokumentiert und ausgewertet.

### 2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem UV-Photometer (NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm bestimmt. Um Proteinverunreinigungen (Absorption bei 280 nm) auszuschließen wurden der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt und nur Proben mit einem Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 verwendet.

### 2.2.3 Isolierung von genomischer DNA

Für die Herstellung von Expressionskonstrukten wurde genomische DNA (gDNA) aus humanen Zellen isoliert und zur Amplifikation von Zielsequenzen verwendet. Hierzu wurde das *Wizard SV Genomic DNA Purification-System* von Promega (Madison, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Konzentration der DNA wurde wie in 2.2.2 beschrieben bestimmt und die isolierte DNA entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung aus Zellen wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 350 µl RLT Puffer (supplementiert mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol) lysiert und durch Zentrifugation über eine QiaShredder®-Säule (13.000x g, 2 min, RT) aufgeschlossen. Das Eluat wurde mit gleichem Volumen 70 %igem Ethanol versetzt und in die RNeasy-Säule überführt. Durch Zentrifugation (15 s; 8000 U/min) wurde die RNA an die Membran gebunden und das Eluat verworfen. Nach einem Waschschriff mit 350 µl Puffer RLT (15 s; 8000 U/min) wurde die nun auf der Säule gebundene RNA durch zwei 30-minütige Inkubationen mit DNase-Lösung (10 µl DNase I in 70 µl RDD Puffer) von verbliebener genomischer DNA gereinigt. Die Säule wurde dreimal mit 700 µl RW1 Puffer und zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen, in ein unbenutztes Auffangröhrchen überführt und zum Trocknen für 2 min bei 13.000x g zentrifugiert. Im

Anschluss wurde die Säulenmatrix mit 30–50 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch einen letzten Zentrifugationsschritt (2 min, 13.000x g) in ein frisches RNA-Röhrchen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

### 2.2.5 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Während bei intakten RNA-Proben lediglich die 18S- und 28S-rRNA-Banden zu erkennen sind, deuten zusätzliche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Kontamination oder Degradation der RNA hin. Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-PCR mit isolierter RNA als Matrize durchgeführt. Nur RNA-Proben, bei denen keine GAPDH-Bande amplifiziert wurde, wurden für die reverse Transkription verwendet.

**Tabelle 2-5: GAPDH-Kontroll-PCR.**

Links: Reaktionsansatz, rechts: PCR-Programm. Reaktionspuffer und DNA-Polymerase wurden von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen. Die PCR Reaktion wurde mit einem TGradient Thermocycler von Biometra (Göttingen) durchgeführt.

PCR-Komponenten	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
RNA	2,0	95	4:00	1
5x <i>Green GoTaq<sup>TM</sup></i> Reaktionspuffer	5,0	95	0:30	30
GAPDH-Primer-Mix (10 µM)	1,0	52	0:45	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0	72	1:00	
<i>GoTaq<sup>TM</sup></i> DNA-Polymerase	0,4	72	5:00	1
Aqua bidest. ad 20 µl	10,6	4	Pause	1

### 2.2.6 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus einem RNA-Template die dazu komplementäre cDNA (*complementary DNA*) hergestellt werden. Für die vorliegende Arbeit wurden eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (=Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *MMLV* (*moloney-murine leukemia virus*) verwendet. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt einen Primer zur Synthese, der an die RNA bindet. Meist wird ein Oligo-dT-Abschnitt verwendet (10-15 Thyminbasen), der komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist. Alternativ werden sog. *random* Hexamer-Primer (Oligonukleotide, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleinbasen bestehen) eingesetzt. Für die cDNA-Synthesen wurde das Advantage<sup>®</sup> RT-for-PCR Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet, welches neben einer retroviralen *MMLV* (*moloney-murine leukemia virus*) Transkriptase alle weiteren benötigten Komponenten enthielt. Die Zusammensetzung und der Ablauf einer cDNA-Synthese sind in Tabelle 2-6 dargestellt.

Die cDNA wurde durch Zugabe von 80 µl DEPC-behandeltem Wasser (Ambion/*Applied Biosystems*, Darmstadt) 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei –80 °C gelagert.

**Tabelle 2-6: Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.**

Komponente	Volumen [µl]	Inkubation
Gesamt-RNA	500 ng	2 min bei 70 °C
Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer	1,0 µl	
Aqua bidest. (RNase-frei)	Ad 13,5 µl	
5-fach Reaktionspuffer	4,0 µl	1 h bei 42 °C + 5 min bei 95 °C
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0 µl	
Rekombinanter RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	
<i>MMLV</i> -Reverse-Transkriptase (200 U/µl)	1,0 µl	
Gesamtvolumen	20,0 µl	

### 2.2.7 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Expression von Genen der NADPH-Oxidase-Enzymfamilie auf mRNA-Ebene wurde mit Hilfe genspezifischer Primer analysiert. Basierend auf der Sequenzinformation der jeweiligen mRNA wurden die Primerpaare so gewählt, dass die Länge des resultierenden Amplikons zwischen 200 und 1000 bp betrug. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurogentec (Köln). Amplifiziert wurden die DNA-Fragmente durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der DNA-Polymerase GoTaq<sup>™</sup> (Promeaga, Madison, USA) in einem Gradienten *Thermocycler* (Biometra, Göttingen). Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide mit den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen findet sich im Anhang.



**Tabelle 2-7: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR.**

PCR-Komponente	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
cDNA	2,0	95	5:00	1
5x <i>GoTaq</i> <sup>TM</sup> Reaktionspuffer	5,0	95	0:30	33-36
Primer-Mix (jeweils 10 µM)	1,0	T <sub>anneal</sub>	0:30	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0	72	1:20	
<i>GoTaq</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	0,4	72	5:00	1
Aqua bidest. ad. 20 µl	10,6	4	Pause	1

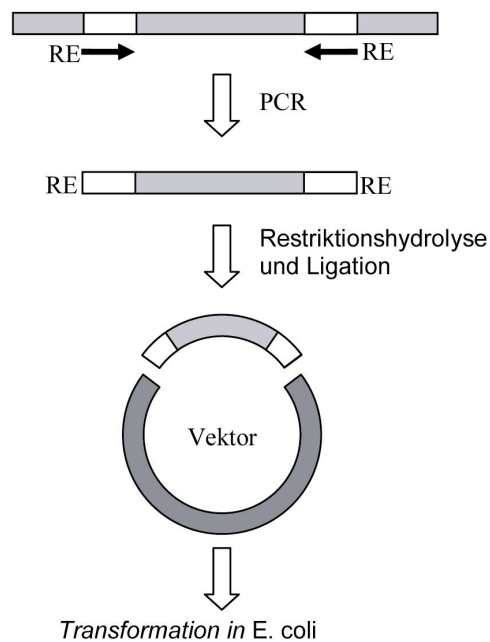
Für eine semiquantitative Auswertung wurde die Zykluszahl für jedes Gen so niedrig gewählt, dass die Amplifikation im nicht-gesättigten Bereich lag. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) aufgetrennt und mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, USA) densitometrisch quantifiziert. Die Expression entsprechender Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Relation zur GAPDH-Expression berechnet.

### 2.2.8 Herstellung von Überexpressionskonstrukten

Eine Übersicht der verwendeten Konstrukte findet sich im Anhang. Im Folgenden wird beispielhaft die methodische Vorgehensweise dargestellt.

#### Amplifikation von Zielsequenzen

Für die Generierung des Konstrukts pEGFP-NOX4 wurden zunächst genspezifische Primer entworfen, welche von der Firma Metabion International AG (Planegg-Martinsried) bezogen wurden. Die Amplifikation wurde mit Advantage2®-Polymerase-Mix (Clontech, Heidelberg) in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Primerpaare die gesamte Zielsequenz voramplifiziert. Im zweiten Schritt wurde die erste Reaktion als Ausgangstemplate für eine Amplifikation mit modifizierten Primern benutzt. Dieses zweite Primerpaar enthielt am 5'-Ende zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme und diente der gerichteten Insertion des Amplikons in die MCS (*multiple cloning site*) des jeweiligen Zielvektors. Die Abbildung 2-1 zeigt schematisch die Vorgehensweise für die Erstellung eines Konstrukts.



**Abbildung 2-1: Schema der PCR-basierten Amplifikation der Ziel-DNA mit Hilfe eines Primerpaares**

Die Pfeile stehen für die jeweiligen Primer, weiße Kästchen symbolisieren die Primer-Bindungsstellen, RE steht für zusätzliche Restriktionsschnittstellen an den 5'-Enden.

Die Tabelle 2-8 zeigt exemplarisch die Zusammensetzung einer typischen Klonierungs-PCR, in diesem Fall für NOX4. Durch die Wahl einer hohen Primerhybridisierungstemperatur wurden unspezifische Primer-Anlagerungen an die Matrizen-DNA reduziert.

Nach erfolgter Amplifikation einer entsprechenden Zielsequenz wurde zur Kontrolle ein 5 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes in einem SYBR<sup>®</sup> Safe-haltigen 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer UV-Geldokumentationsanlage unter UV-Licht visuell ausgewertet (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen).

**Tabelle 2-8: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer Klonierungs-PCR.**

PCR-Komponente	Volumen/ Menge	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Matrizen-DNA	200 ng	95	1:00	1
10x Advantage2 <sup>®</sup> -PCR-Puffer	5 µl	95	0:30	20-25
Primer-Mix (jeweils 10 µM)	1 µl	T <sub>anneal</sub>	0:30	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1 µl	68	1:00	
50x Advantage2 <sup>®</sup> -Polymerase-Mix	0,4 µl	68	5:00	1
Aqua bidest.	ad 25 µl	4	Pause	1

### Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die identifizierten DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel mit dem Qiaquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) eluiert. Dazu wurden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein tarliertes Reaktionsröhrchen überführt und gewogen. Die DNA wurde nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und mit 20-50 µl Nuklease-freiem Wasser in ein sauberes Röhrchen eluiert (1 min; 12.000 U/min).

### Restriktionshydrolyse

Das gereinigte PCR-Produkt diene als Insert für den pEGFP-Vektor. Vektor und Insert wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *NdeI* geschnitten. Die beiden Restriktionsenzyme erkennen eine spezifische palindromische Sequenz innerhalb doppelsträngiger DNA und hydrolysieren die DNA an dieser Stelle.

Die Tabelle 2-9 zeigt exemplarisch einen Reaktionsansatz einer typischen Doppelrestriktionshydrolyse. Die Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma *New England Biolabs* (Bad Schwalbach) bezogen. Die Auswahl der entsprechenden Enzyme richtete sich dabei nach den Restriktionsschnittstellen innerhalb der *multiple cloning sites* (MCS) der jeweiligen Plasmide und optimalen Kombination zweier Restriktionsendonukleasen. Letzterer Punkt ist insofern von Bedeutung, als dass es bei bestimmten Enzymkombinationen zu einer *Star*-Aktivität kommen kann. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, für 10 min bei 80 °C inaktiviert und aufgereinigt.

**Tabelle 2-9: Exemplarische Zusammensetzung einer Doppelrestriktion.**

Komponente	Nukleinsäure	
	Plasmid	Insertion
Nukleinsäure	1 µg	0,1-0,3 µg
10x Puffer	3 µl	3 µl
10x BSA (10 mg/ml)	3 µl	3 µl
Enzym 1 (20 U/µl)	1 µl	1 µl
Enzym 2 (20 U/µl)	1 µl	1 µl
Aqua bidest.	ad 30 µl	ad 30 µl

### Ligation

Nach der Restriktion wurden Insert und Vektor, die linearisiert vorlagen, durch eine Ligase verknüpft. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe und schließt so die Spaltstellen. Die Ligation eines DNA-Fragments in ein Plasmid erfolgte bei einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor). Vor der Erstellung einer Ligationsreaktion wurde zunächst photometrisch (NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH,

Erlangen) die DNA-Konzentration von eluiertem Plasmid und PCR-Amplikon bestimmt. Mit Kenntnis der Konzentration wurde anschließend die molare Konzentration (fmol/μl) nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{molare Konzentration} \left( \frac{\text{fmol}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{Konzentration} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times 10^6}{\text{Insertlänge (bp)} \times 649 \left( \frac{\text{pg}}{\text{fmol} \times \text{bp}} \right)}$$

Für die Ligation wurde das Quick Ligation Kit der Firma *New England Biolabs* (Bad Schwalbach) verwendet, das eine Ligase aus dem Phagen T4 enthält. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, danach 5 min bei 25°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt oder weggefroren. Für ein analytisches Agarose-Gel wurden 5 μl mit 1 μl Probenpuffer versetzt. Der Tabelle 2-10 sind die Komponenten und Mengen eines typischen Ligationsansatzes zu entnehmen.

**Tabelle 2-10: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.**

Komponente	Menge
aufgereinigtes Plasmid nach Restriktionshydrolyse	15 fmol
aufgereinigtes Insert (PCR-Amplikon nach Restriktionshydrolyse)	45 fmol
10x Pufferkonzentrat	2 μl
T4-Ligase (2,5 U/μl)	1 μl
Aqua bidest	ad 20 μl

### Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von DNA durch geeignete, kompetente Wirtszellen. Wird das Plasmid aufgenommen, kann es dank seiner Replikationssequenz (pUC ORI) stabil bei der Zellteilung weitergegeben werden. Positive Bakterienklone werden dann über ein im Plasmid lokalisiertes Resistenzgen (z.B. *Ampicillin Resistance Gene*) selektiert. Für die Transformation wurden 75 μl kompetente *One shot Top 10 Escherichia coli*-Zellen von Invitrogen (Carlsbad, USA) auf Eis aufgetaut, mit 1 μl Plasmid bzw. Ligation (ca. 50 ng) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen, für 5 min auf Eis abgekühlt, mit 550 μl SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad) gemischt und 45-60 min bei 37 °C im Schüttler (200 U/min, Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, GB). inkubiert. Auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz wurden 50 μl ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden bei 4 °C nicht länger als 4 Wochen im Kühlschrank gelagert.

### **Plasmid-Mini-Präparation**

Zur Identifizierung von Klonen, die das korrekte Insert enthielten, wurden pro Transformationsansatz 10-12 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 2-3 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmid Mini-Präparation mit Hilfe des QIAprep®-MiniPrep-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben. Das Verfahren der Plasmid Mini-Präparation basiert auf der 1979 von Birnboim und Doly beschriebenen alkalischen Lyse und ist heute die am häufigsten verwendete Methode.

Die Reinheit und die Konzentration der Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt und die DNA teilweise direkt für Transformationen eingesetzt, beziehungsweise bei -20 °C eingefroren. Durch Restriktionsverdau bzw. PCR mit den Klonierungsprimern wurden die isolierten Plasmide auf die korrekte Insertion der Ziel-DNA überprüft.

### **Plasmid-Maxi-Präparation**

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. Ein Erlenmeyerkolben mit 250 ml antibiotikahaltigem LB-Medium wurde mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert (200 U/min, Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, UK). Am nächsten Tag wurde ein Teil der Bakterienkultur mit Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. Die restliche Kultur wurde bei 4 °C zentrifugiert (15 min, 4.000 U/min; Varifuge 3.0R, Heraeus, Hannover) und unter Verwendung des QIAfilter Maxiprep Kits (Qiagen, Hilden) wurden die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

### **Sequenzierung klonierter DNA**

Die Sequenz aller verwendeten Konstrukte wurde mittels „Taq-Cycle-Sequencing“ überprüft. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger, für die das *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* von Applied Biosystems (Foster City, USA) benutzt wurde. Farbstoffmarkierte Didesoxynukleotid-triphosphate werden in der PCR-Reaktion inkorporiert und führen zu einem Kettenabbruch des synthetisierten DNA-Stranges. Im Kapillarsequenzierer (ABI PRISM® 3700 Kapillarsequenzierer, Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden die amplifizierten DNA-Fragmente als einzelne Farbbanden detektiert und analysiert. Da die maximale Leselänge einer Sequenzierungsreaktion ungefähr bei 800 bp lag, wurden längere DNA-Abschnitte in mehreren Schritten sequenziert. Dabei wurden Primer verwendet, mit denen sich überlappende Sequenzabschnitte verifiziert werden konnten. Ein Beispiel für einen Reaktionsansatz ist in der Tabelle 2-11 dargestellt.

**Tabelle 2-11: Reaktionsansatz für eine Sequenzierung (links) und Programmierung des Thermocyclers (rechts).**

PCR-Komponente	Volumen/ Menge	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Matrizen-DNA	300 ng	95	1:00	1
Big Dye V.5	5 µl	95	0:10	30
Primer (4,8 pmol/µl)	1 µl	50	0:05	
Aqua bidest.	ad 10 µl	60	4:00	
		4	Pause	1

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

Für die verschiedenen quantitativen und qualitativen Proteinanalysen wurde das Gesamtprotein isoliert. Die Zellen wurden in 100 µl gekühltem 1x DLB Lysepuffer, dem 1 % Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma, München) und 2 % 50X Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) hinzugegeben wurden, resuspendiert. Die Lysate wurden für 5 min bei 99 °C aufgekocht und nach Ultraschallbehandlung (2x 5 s) zentrifugiert (16.000x g; 15 min; 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für weitere Versuche auf Eis inkubiert oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

### 2.3.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford-Test unter Verwendung des DC (*Detergent Compatible*) Protein Assays (Biorad, München) ermittelt. Diese Methode basiert auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie *brilliant blue* G-250 an die hydrophoben Bereiche innerhalb eines Proteins. In der Folge verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Für die Messung wurden 2 µl Proteinprobe 1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnt und mit den Assay-Reagenzien versetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und über die BSA Eichgerade die Proteinkonzentration der Proben kalkuliert.

### 2.3.3 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Das Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli beruht auf der Trennung negativ geladener SDS-Protein-Komplexe durch Gelelektrophorese. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine oder Proteinkomplexe bis zur Primärstruktur entfaltet und die Eigenladung der Proteine überdeckt. Zusätzlich werden inter- und intramolekulare Proteinbindungen durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT; Sigma, München) aufgebrochen.

Die denaturierten Proteine werden schließlich durch ihr konstantes Ladung/Masse-Verhältnis im Polyacrylamidnetz nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zunächst wurde das Gel für die Elektrophorese aus den einzelnen Komponenten (Tabelle 2-12 und Tabelle 2-13) hergestellt. Die Polymerisationsreaktion von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid wurde durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie den Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) ausgelöst. Je nach Größe des Zielproteins wurde der Acrylamid-Anteil und somit die Porengröße verändert.

Die äquilibrierten Proteinproben wurden kurz vor Beladen des Gels mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten auf 99 °C erhitzt und abzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit jeweils 15 µg Protein beladen und zusammen mit 5 µl eines Molekulargewichts-Standards (Precision Plus Protein™ Dual Color, BioRad, München) in Gelkammern des Typs Multigel G44 (Biometra, München) aufgetrennt. Dabei wurden die Proben im Sammelgel bei 15 mA/Gel (PP 3000 High Voltage Power Pack, Biometra) für 30 min fokussiert und anschließend im Trenngel je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins bei 30 mA/Gel für 45-90 min aufgetrennt.

**Tabelle 2-12: Zusammensetzung eines Trenngels.**

Komponente	Größe des Zielproteins [kDa]			
	10-60	20-100	30-120	50-200
Acrylamid	15 %	12 %	10 %	7,5 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua bidest.	2,5 ml	3,5 ml	4,15 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10 % (v/w) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

**Tabelle 2-13: Zusammensetzung eines Sammelgels.**

Komponente	Sammelgel (3 % Acrylamid)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,3 ml
4x Sammelgelpuffer	0,75 ml
Aqua bidest.	1,95 ml
TEMED	3 µl
10 % (v/w) APS	30 µl

#### 2.3.4 Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western-Blot)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für die anschließende Immundetektion aus den Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) transferiert. Die Bezeichnung „Western-Blot“ ist eine Anlehnung an die Methode zur DNA-Detektion nach Southern (Southern 1975) und wurde für den Nachweis von Proteinen erstmals durch Towbin beschrieben. In der Größe des Trenngels wurden zunächst eine PVDF-Membran, sowie 3 Whatman-Papiere exakt zugeschnitten.

Vor Blotbeginn wurden die Whatman-Papiere in Anoden- oder Kathodenpuffer 15 min vorinkubiert. Die PVDF-Membran, wurde kurz in Methanol aktiviert und mind. fünf min in Aqua bidest. äquibriert. Der Aufbau des Blot-Sandwiches erfolgte luftblasenfrei und zügig. Der Blot-Stapel aus Whatman-Papier, Gel und Membran wurde zwischen die Graphitplatten der Blottingapparatur (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, BioRad, München) eingesetzt und je nach Anzahl und Größe der Gele ein Strom von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 55 min angelegt.

#### 2.3.5 Immundetektion von Proteinendurch Chemilumineszenz

Für die Detektion der Zielproteine wurden neben einem Zielprotein-gerichteten Antikörper (Primärantikörper) ein zweiter, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) konjugierter Antikörper (Sekundärantikörper) verwendet. Dieser ist gegen die Ursprungsspezies des Primärantikörpers gerichtet. Nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid katalysiert die HRP die Oxidation zu 3-Aminophtalat, das im angeregten Zustand vorliegt und Energie in Form von Licht bei Übergang in den stabilen Grundzustand abgibt. Diese chemilumineszente Reaktion kann mittels geeigneter Röntgenfilme sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran zum Nachweis der Zielproteine zunächst eine Stunde in Magermilchlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TTBS) abgesättigt und anschließend mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) in der gewünschten Verdünnung (in 5 % MMP in TTBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung dekantiert, dreimal für 10 min mit TTBS gewaschen und der Sekundärantikörper (in 5 % MMP in TTBS) hinzugeben. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran mit ECL-Reagenz (ECL PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und drei min bei RT inkubiert. Der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurde je nach Reaktionsintensität zwischen 1 s und 30 min exponiert und anschließend in einer Tischentwicklungsmaschine entwickelt (Curix 60, AGFA, Leverkusen).



**Tabelle 2-14: Verwendete Antikörper und Verdünnungen zur Immundetektion.**

Antikörper	Spezies, Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-NOD2	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cayman Chemical
Anti-GFP	Maus, monoklonal	1:2000	Sigma
Anti-Flag M2	Maus, monoklonal	1:1000	Sigma
Anti- $\beta$ -Aktin	Maus, monoklonal	1:5000	Sigma
Anti-DUOX2	Ziege, polyklonal	1:500	Santa Cruz
Anti-NOX1	Ziege, polyklonal	1:500	Santa Cruz
Anti-mouse-HRP		1:2000	Amersham Biosciences
Anti-rabbit-HRP		1:2000	Amersham Biosciences

Auf der Membran gebundene Antikörper wurden durch sog. „*strippen*“ entfernt. Dabei wurden die Antikörper durch alkalische Denaturierung für 40 min bei 55°C in *stripping*-Puffer entfernt und neue Zielproteine oder Haushaltsproteine ( $\beta$ -Aktin, GAPDH) durch eine wiederholte immunologische Behandlung nachgewiesen.

### 2.3.6 Koimmunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation (Co-IP) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die mögliche Interaktion von NOD2 mit DUOX2 aufzuklären. Zum Präzipitieren wurden Agarose-Beads mit immobilisiertem Protein A/G (Santa Cruz, Heidelberg), sowie die in der Tabelle (Angabe) dargestellten Konstrukte und Antikörper verwendet.

**Tabelle 2-15: Verwendete Konstrukte und Antikörper für die Koimmunpräzipitation.**

Antikörper	Spezies, Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-NOD2	Kaninchen, polyklonal	1:200	Cayman Chemical
Anti-HA	Kaninchen, polyklonal	1:500	Sigma
Anti-GFP	Maus, monoklonal	1:500	Sigma
Anti-Flag M2	Maus, monoklonal	1:500	Sigma

Die Proteine, deren Interaktion nachgewiesen werden sollte, wurden zunächst in HEK-293 Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l RIPA Lysepuffer + Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) resuspendiert und durch Vortexen für 45 s weiter aufgeschlossen. Ein *Pre-clearing* Schritt, bei dem 10  $\mu$ l Protein A/G-Agarosekügelchen zum Lysat hinzugegeben wurden, entfernte unspezifisch bindende

Proteine aus dem Proteinlysats. Nach Zentrifugation (16.000x g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µg eines monoklonalen Antikörpers versetzt, der spezifisch an GFP (*Green Fluorescent Protein*) bindet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Schüttler (*Multi-Axle Rotator A257*, Denley-Tech, England) wurden 25 µl Protein A/G-Agarosekügelchen hinzugegeben und die Proben bei 4 °C über Nacht weiterinkubiert. Am folgenden Tag wurden die Agarosekügelchen abzentrifugiert (5 min, 12.000 U/min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit kaltem RIPA-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 40 µl 2x SDS-Ladepuffer, sowie fünfminütigem Aufkochen und anschließendem Zentrifugieren eluiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mittels SDS-PAGE und Immunblot auf die Anwesenheit von präzipitierten NOD2-GFP und kopräzipitiertem DUOX2-HA überprüft.

### 2.3.7 Rac1 Aktivierungs-Assay

Rac1 ist eine GTPase, die zu einer Unterfamilie der RHO-Proteine zählt. In ihrer Funktion als molekularer Schalter wechselt sie zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Aktiviertes Rac1 bindet spezifisch an die p21-Bindedomäne (PBD) der p21-aktivierten Proteinkinase-1 (Pak-1). Daher kann die PBD von Pak-1 benutzt werden um gezielt die aktivierte Form von Rac1 aus dem Lysat zu isolieren.

Für die Bestimmung der NOD2-vermittelten Rac1 Aktivierung wurde das *Rac1 activation kit* (Pierce, Rockford, IL) verwendet. HEK-293 oder Caco-2 Zellen wurden auf 10 ml-Schalen ausgesät und bis 90-100 % Konfluenz inkubiert. Caco-2 Zellen wurden mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 h vorstimuliert, um die Expression von endogenem NOD2 zu erhöhen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 µg/ml MDP, 5 ng/ml TNF- $\alpha$  oder nur Medium für 10 min stimuliert, lysiert und mit dem GST-Fusionsprotein GST-Pak1-PBD für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Das an Glutathion-Agarosekügelchen gebundene, aktivierte Rac1 wurde dreimal in 500 µl Waschpuffer gewaschen und durch Zugabe von 50 µl 2x denaturierendem Ladepuffer (2-Mercaptoethanol) sowie fünfminütigem Erhitzen bei 95 °C eluiert. Das eluierte Protein wurde mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert.

### 2.3.8 ELISA

Der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde zum Nachweis von sezerniertem Interleukin-8 (IL-8) unter Verwendung des *Human IL-8 CytoSets* von Biosource (Solingen) durchgeführt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Immobilisierung von IL-8 durch einen spezifischen, an eine Oberfläche gekoppelten Antikörper (sog. *Capture* Antikörper) und der anschließenden immunologischen und kolorimetrischen Detektion. Für diesen Schritt wird ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper (sog. *Detection* Antikörper) verwendet, der die Umsetzung einer Farbstoffvorstufe in einen Farbstoff katalysiert.

Da die Absorptionsintensität proportional zur Konzentration an Peroxidase ist, und diese wiederum die Menge an immobilisiertem Antigen widerspiegelt, kann über eine Eichkurve die Konzentration an sezerniertem IL-8 bestimmt werden.

Für die Bestimmung der NOD2 vermittelten IL-8-Sekretion wurden die entsprechend transfizierten und stimulierten Zellen verworfen und je 100 µl der Medienüberstände (als Triplettbestimmung) auf eine mit *Capture* Antikörper behandelte 96-well-Platte übertragen. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte mit PBS-Tween gewaschen und wiederum für eine Stunde mit dem *Detection* Antikörper inkubiert. Anschließend wurde nach wiederholtem Waschen das Peroxidase-Substrat hinzugegeben und die Absorption des Farbstoffs bei 450 nm mit Hilfe des GeniosPro-Plattenreaders (Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt.

## **2.4 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies**

Für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies existiert eine Reihe von Reagenzien, die auf unterschiedlichen Nachweisreaktionen beruhen und sich in ihrer Sensitivität und Spezifität stark unterscheiden. Um, wie in dieser Arbeit geschehen, ROS in physiologischen Konzentrationen nachzuweisen, wurde der cDCF-Assay, die Luminol- oder Bodipy-Messung durchgeführt.

### **2.4.1 cDCF-Assay**

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS-Produktion wurde der redoxsensitive Farbstoff cH<sub>2</sub>DCFDA (5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (Invitrogen, Karlsruhe) gewählt. Intrazelluläre Esterasen spalten nach zellulärer Aufnahme des Moleküls die Acetatgruppe ab, wodurch der Indikator nicht mehr membrangängig ist und im Zytoplasma verbleibt. Durch ROS-induzierte Oxidation entsteht das fluoreszierende Produkt Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein (cDCF), dessen Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der entstehenden ROS ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Caco-2 oder HEK-293 Zellen mit 15 µM cDCF für 30 min beladen, mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium weiter inkubiert. Nach einer 30-minütigen Pause wurde die basale Fluoreszenz gemessen und die Zellen mit 10 µg/ml MDP, ansteigenden Konzentrationen von 10 bis 1.000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positivkontrolle) oder Medium allein (Negativkontrolle) stimuliert. Die Zellen wurden alle 4 min über einen Zeitraum von 40 min gemessen. Die ROS-Bildung wurde schließlich als lineare Regressionsgerade zwischen der Anfangsfluoreszenz und den nachfolgenden Fluoreszenzwerten dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens fünfmal wiederholt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines GeniosPro-Plattenlesegerätes (Tecan Trading AG, Crailsheim) bei 485 nm Anregungswellenlänge und 530 nm Emissionswellenlänge detektiert.

### 2.4.2 Luminol-Assay

Alternativ zur cDCF-Messung wurde die ROS-Produktion durch einen Luminol-Assay ermittelt. Das Prinzip der Chemilumineszenz-Reaktion wird auch zur Proteindetektion nach einem Immunblot angewandt (siehe 2.3.5).

Für den Assay wurden die isolierten murinen Kolonepithelzellen oder Gewebeproben in 100 µl PBS aufgenommen und mit 10 µl HRP (16 U/ml), 10 ng/ml MDP oder Medium alleine versetzt und die Reaktion nach Zugabe von 5 µl Luminol gestartet. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des GeniosPro-Plattenlesegerätes (Tecan Trading AG, Crailsheim) nach 30 min ermittelt.

### 2.4.3 Bodipy-Messung

Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Bodipy 581/591 C<sub>11</sub> (Invitrogen, Karlsruhe) lagert sich in Lipid-haltigen Umgebungen wie Membranen ein. Durch die Interaktion mit Peroxylradikalen oxidiert der Farbstoff und verändert seine Fluoreszenz, dieser Fluoreszenz-*shift* spiegelt daher die ROS-Produktion wider.

Für den Assay wurden HEK-293 und Caco-2 Zellen auf 96-*well*-Platten ausgesät und entsprechend transfiziert. Bei einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen für 30 min mit 2 µM Bodipy (HEK-293 Zellen) oder 10 µM Bodipy (Caco-2 Zellen) in DMEM-Medium inkubiert. Das Farbstoff-haltige Medium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig mit erwärmten PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 10 ng/ml MDP oder *Listeria monocytogenes* (MOI=100) stimuliert, einmal mit erwärmten PBS gewaschen und die Fluoreszenz im GeniosPro-Plattenlesegerätes (Tecan Trading AG, Crailsheim) gemessen. Der reduzierte Farbstoff wurde bei  $\lambda_{\text{Ex}}=540$  nm und  $\lambda_{\text{Em}}=595$  nm detektiert, die Fluoreszenz des oxidierten Farbstoffes bei  $\lambda_{\text{Ex}}=480$  nm und  $\lambda_{\text{Em}}=520$  nm. Zur Auswertung wurde der Quotient aus Fluoreszenz<sub>oxidiert</sub>/Fluoreszenz<sub>total(ox+red)</sub> ermittelt.

## 2.5 Immunhistochemische Methoden

Die intrazelluläre Lokalisation von NOD2 und Proteinen der NADPH-Oxidase-Enzymfamilie wurde immunhistochemisch überprüft. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Zellen auf Deckgläsern ausgesät, fixiert, wenn notwendig mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop mit integriertem Apotom (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) betrachtet. Die Beobachtungen wurden mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (AxioCam MR, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) dokumentiert, die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit der Software AxioVision V4.5 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen).

**Tabelle 2-16: Verwendete Plasmide und Antikörper der Immunhistochemie.**

Plasmid	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-NOD2	Kaninchen, polyklonal	1:200	Cayman Chemical
Anti-NOX1	Ziege, polyklonal	1:100	Santa Cruz
Anti-DUOX2	Ziege, polyklonal	1:100	Santa Cruz
Anti-HA	Kaninchen, polyklonal	1:500	Sigma
Anti-GFP	Maus, monoklonal	1:500	Sigma
Anti-Flag M2	Maus, monoklonal	1:500	Sigma

**Tabelle 2-17: Filtersätze für Fluoreszenzmikroskopie.**

Fluoreszentes Protein / Fluorochrom	Filtersatz
CFP (AmCyan)	47
YFP (ZsYellow)	46
EGFP (enhanced GFP)	38
DAPI	49

### 2.5.1 Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Für die immunhistochemischen Färbungen und die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen zunächst mit Paraformaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt) fixiert. Bei diesem Prozess werden die Proteine durch Polymerisation vernetzt und irreversibel denaturiert, so dass die Membran für Antikörper und Farbstoffe permeabel und das Präparat konserviert wird.

Die entsprechend stimulierten und transfizierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS sichergestellt, dass alle PFA-Rückstände entfernt wurden.

### 2.5.2 Färbung von intrazellulären Proteinen und nukleärer DNA

Die permeabilisierten Zellen wurden zunächst für eine Stunde in 1 % BSA-PBS geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden und anschließend mit den jeweiligen Primärantikörpern in der entsprechenden Verdünnung in 0,75 % BSA-Triton PBS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper für 45 min hinzugegeben und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zur Kontrastfärbung wurde die nukleäre DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Sigma, München) sichtbar gemacht. Die Zellen wurden hierzu mit 500 µl DAPI-PBS-Lösung (1:1000) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Bei allen Färbeschritten wurden die Zellen mit Aluminiumfolie abgedeckt um ein Ausbleichen der

Fluorochrome zu verhindern. Abschließend wurden die Deckgläser auf einem Objektträger in 30  $\mu$ l *Anti-mounting*-Lösung (Vectashield Hard Set™ H-1400, Vector Laboratories, Inc. Burlingame) fixiert.

## 2.6 Reportergenassay

Die NOD2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde durch den dualen Luziferase-Reportergenassay nachgewiesen. Die ermittelte Luziferase-Aktivität ist proportional zur Expression eines Reportergens. Die verwendeten Luziferasen stammen aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* sowie dem marinen Cnidarier *Renilla reniformis*.

Zur quantitativen Analyse der NF- $\kappa$ B-Transaktivierung wurde der Reportervektor pNF $\kappa$ B-LUC (Clontech) verwendet, der für die Leuchtkäfer-Luziferase kodiert und einen Minimalpromoter mit drei NF- $\kappa$ B-consensus-Enhancer-Elementen enthält. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und der Zellvitalität wurde das Plasmid pRL-TK (Promega, Madison, USA) verwendet, das für die zweite Luziferase kodiert, die unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (Thymidinkinase-Promotor) steht. Die Eigenschaft der beiden Luziferasen, unterschiedliche Substrate umzusetzen, wird durch unterschiedliche Substrat-Pufferlösungen und die zeitliche Trennung der Messung ausgenutzt.

Die Zellen wurden mit einem Transfektionsmix behandelt, der aus 12 ng Reportervektor pNF- $\kappa$ B-LUC, 3 ng Kontrollvektor pRL-TK und zusätzlichen Plasmiden (z.B. NOD2 oder Kontrollvektor) bestand und auf 50 ng DNA-Gesamtmenge eingestellt wurde. Vor dem Assay wurden die Zellen in 25  $\mu$ l 1X PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega, Madison, USA) lysiert. Die automatisierte Substratzugabe und Lumineszenzmessung erfolgte durch ein GeniosPro-Plattenlesegerät (Tecan Trading AG, Schweiz). Für die Messungen wurde der *Dual-Luciferase-Assay* (Promega, Madison, USA) eingesetzt. Die relative Luziferase-Aktivität (RLU) wurde aus dem Quotienten der Leuchtkäfer- und der *Renilla*-Luziferase-Messwerte berechnet.

## 2.7 Bildanalyse mit ImageJ

Eine Analyse von Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit dem nicht-kommerziellen Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 ROS als Mediatoren der NOD2-Signaltransduktion

Wie in der Einleitung dargelegt, agieren ROS als intrazelluläre Botenstoffe. Initial wurde die Frage überprüft, ob ROS als Mediatoren der NOD2-Signalgebung dienen. Ihr Nachweis erfolgte mittels redoxsensitiver Farbstoffe in immortalisierten Epithelzellen und primären murinen Kolonepithelzellen.

##### 3.1.1 Epithelzellen produzieren ROS nach MDP-Stimulation

Die intrazelluläre ROS-Entstehung wurde in transfizierten HEK-293 und Caco-2 Zellen mittels cDCF-Fluoreszenz in einem Tecan GeniosPro-Plattenlesegerät analysiert. Bei jeder ROS-Messung wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen auf der gleichen 96-well Platte mitgemessen (siehe Abbildung 3-1). Zellen, die ohne Fluoreszenzfarbstoff oder statt einem Stimulus nur mit PBS inkubiert wurden, dienten als Negativkontrollen. Für die Positivkontrollen wurden Zellen mit ansteigenden Konzentrationen  $H_2O_2$  (0,1-10  $\mu M$ ) behandelt.

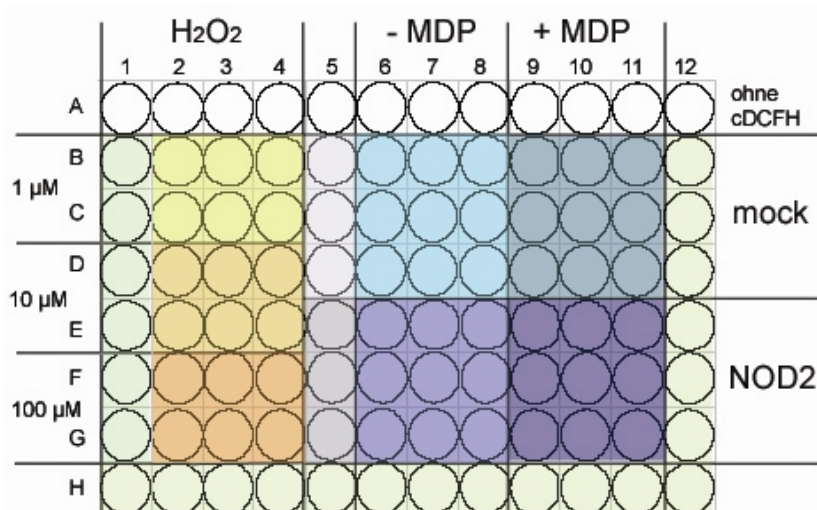
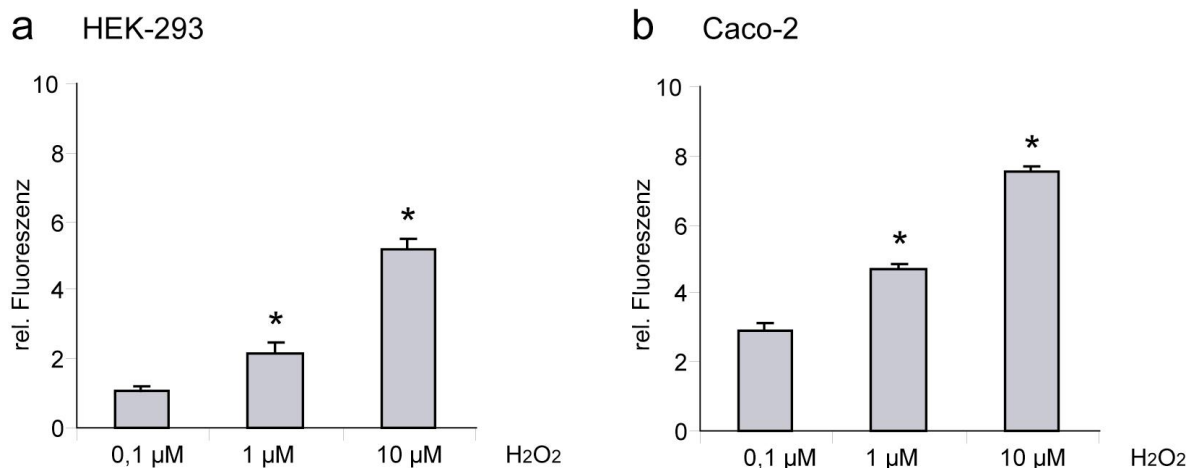


Abbildung 3-1: Experimentelles „Design“ der cDCF-Messung im 96-well-Format.

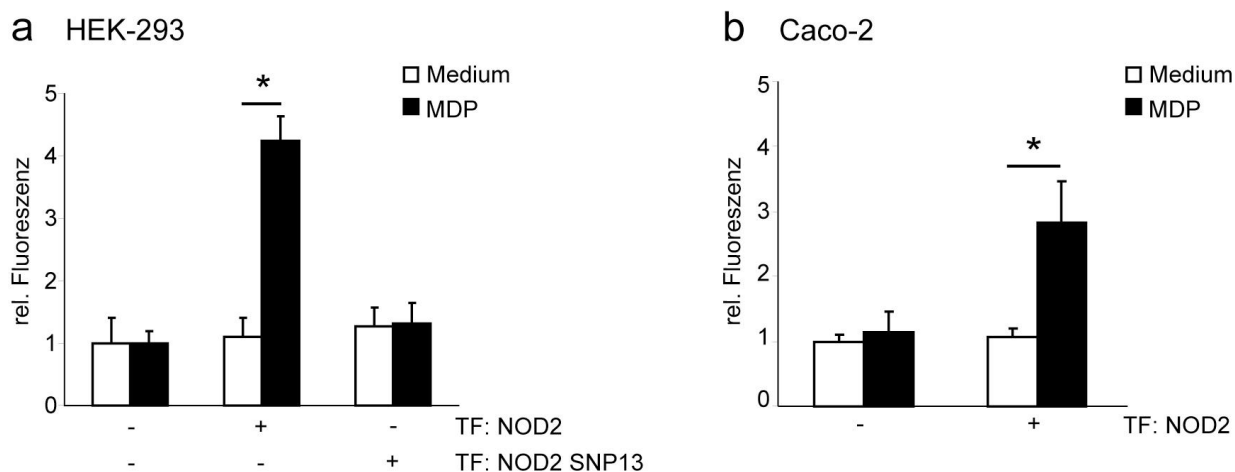
Die Auswertung der Positivkontrollen (siehe Abbildung 3-2) zeigte eine positive Korrelation zwischen der  $H_2O_2$ -Konzentration und der Fluoreszenzintensität. Nur wenn dieses Kriterium bei allen Messungen erfüllt war, wurden die Daten der betreffenden Platte weiter ausgewertet.



**Abbildung 3-2: Auswertung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Positivkontrolle im cDCF-Assay.**

Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von HEK-293 (a) und Caco-2 (b) Zellen nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ansteigenden Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=6; \*, p<0,05).

Die Auswertung der ROS-Messung ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Stimulation mit MDP führte nur in den NOD2-transfizierten HEK-293 und Caco-2 Zellen gegenüber der mock-transfizierten Kontrolle zu einer signifikant erhöhten cDCF-Fluoreszenz. Der Anstieg der Fluoreszenz, und die damit korrelierte Bildung von ROS, war etwa 15-20 Minuten nach Stimulations- und Messbeginn nachweisbar. Die mit Morbus Crohn assoziierte NOD2-SNP13 Variante ist durch eine verminderte ROS-Entstehung gekennzeichnet.



**Abbildung 3-3: Nachweis von NOD2-abhängig generierten ROS in Epithelzellen.**

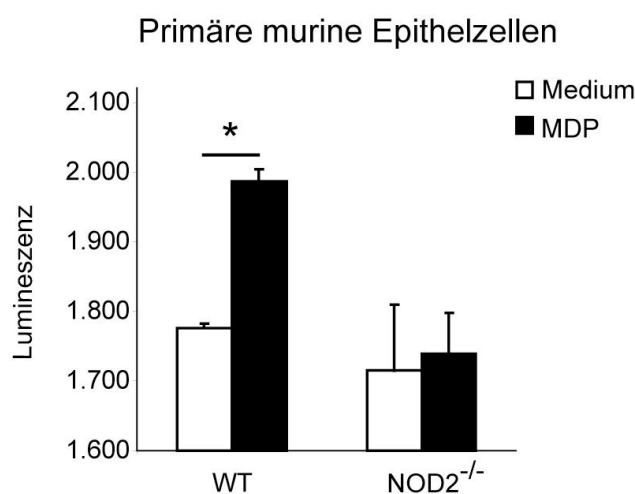
cDCF-Assay in NOD2- und NOD2-SNP13-transfizierten (TF) HEK-293 (a) oder NOD2-transfizierten Caco-2 (b) Zellen. Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von MDP-stimulierten (10 µg/ml) Zellen im Vergleich zu Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=9; \*, p<0,05).



### 3.1.2 NOD2-defiziente murine Kolonepithelzellen zeigen eine verminderte ROS-Produktion

Die beobachtete NOD2-abhängige ROS-Entstehung sollte im Tiermodell verifiziert werden. Hierfür wurden primäre Kolonepithelzellen von NOD2<sup>-/-</sup>-*knockout* und Wildtyp-*littermate*-Mäusen (Stamm: B6.129S1-Nod2tm1Flv/J) isoliert. Die ROS-Entstehung wurde mittels Luminol-Chemilumineszenz detektiert, da die Zellen unmittelbar nach der Isolierung gemessen wurden.

Die Zellen der NOD2-defizienten Mäuse zeigten im Unterschied zu den Zellen der Wildtyp-*littermate* Tiere keinen Anstieg der Lumineszenz nach MDP-Stimulation (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4: Nachweis von MDP-abhängig generierten ROS in murinen primären Kolonepithelzellen von Wildtyp-*littermate* (WT)- und NOD2-defizienten-Mäusen.**

Luminol-Chemilumineszenz-Assay in primären, aus dem Kolon von transgenen NOD2<sup>-/-</sup>- oder Wildtyp-Mäusen isolierten Epithelzellen. Gezeigt ist die Lumineszenz nach MDP-Stimulation im Vergleich zur Inkubation mit Medium (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=3; \*, p<0,05).

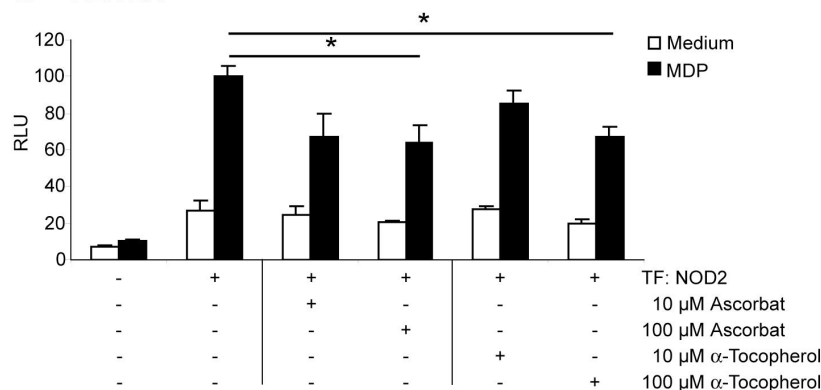
### 3.1.3 Antioxidantien vermindern die NOD2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Um den Einfluss der entstehenden ROS auf die weitere NOD2-abhängige Signaltransduktion zu untersuchen, wurden HEK-293 Zellen mit Antioxidantien vorbehandelt und die MDP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung gemessen.

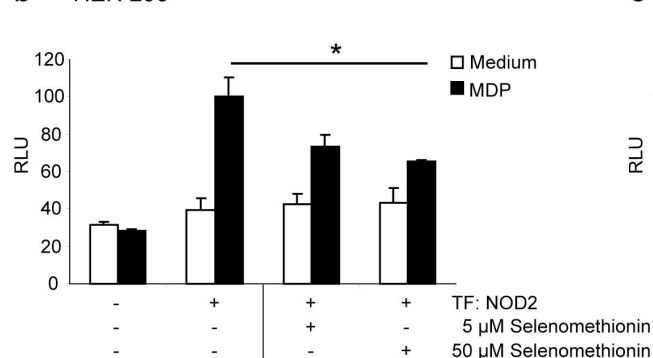
Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde mit Hilfe des Dualen-Luziferase-Reporter-Gen-Assays quantifiziert. Um eine mögliche Redoxregulation nachzuweisen, wurden Antioxidantien aus unterschiedlichen Substanzklassen verwendet und eine halbe Stunde vor der MDP-Stimulation zu den Zellen hinzugegeben.

Alle verwendeten Antioxidantien reduzierten die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK-293 Zellen (siehe Abbildung 3-5). Eine signifikante Verminderung wurde durch L-(+)-Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol (jeweils 100  $\mu$ M) und der antioxidativ wirksamen Aminosäure Selenomethionin (50  $\mu$ M) erzielt. Ebenfalls bewirkten das Flavanol (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG, 10  $\mu$ M) und das Polyphenol Resveratrol (30  $\mu$ M) eine signifikante Reduktion der MDP-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

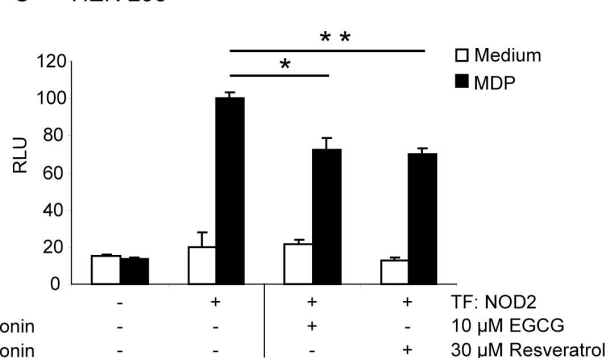
a HEK-293



b HEK-293



c HEK-293



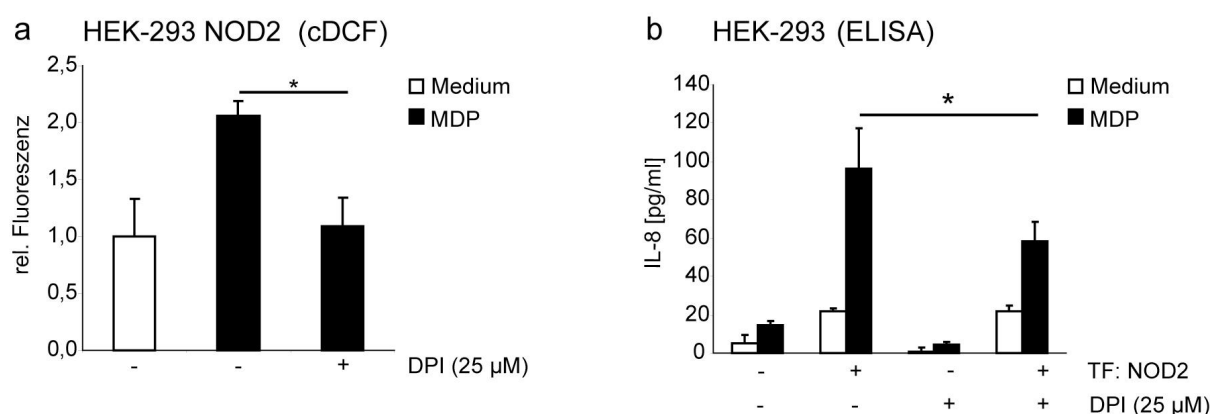
**Abbildung 3-5: Einfluss von Antioxidantien auf die MDP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung.**

HEK-293 Zellen wurden mit einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Luziferase-Reportergen, einem pRL-TK *Renilla* Plasmid zur Normalisierung und einem Überexpressionskonstrukt für NOD2 kotransfiziert. Die Zellen wurden mit (a) L-(+)-Ascorbinsäure (Ascorbat; 10, 100  $\mu$ M),  $\alpha$ -Tocopherol (10, 100  $\mu$ M), (b) Selenomethionin (5, 50  $\mu$ M), (c) (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG, 10  $\mu$ M) oder Resveratrol (40  $\mu$ M) präinkubiert und für 6 h mit 10  $\mu$ g/ml MDP stimuliert. Zur Analyse der MDP-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde das duale Luziferase-Reportergen-Assay verwendet. Die Luziferase-Aktivität ist als relative Lichteinheit (RLU, *relative light units*) dargestellt (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=3; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

### 3.1.4 DPI vermindert die NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8-Sekretion

Um den subzellulären Ursprung der durch NOD2 induzierten ROS näher zu charakterisieren, wurden NADPH-Oxidasen als potenzielle enzymatische Quellen funktionell weiter analysiert. Hierzu wurde untersucht, ob die ROS-Produktion sowie die NOD2-abhängige Sekretion des pro-inflammatorischen Chemokins IL-8 als direktes Zielgen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Diphenyliodonium (DPI) beeinflussbar sind. Der Flavoprotein-Inhibitor DPI hemmt spezifisch Untereinheiten der NADPH-Oxidasen.

HEK-293 Zellen, die mit DPI präinkubiert und anschließend mit MDP stimuliert wurden, zeigten eine verminderte NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8-Sekretion (siehe Abbildung 3-6).



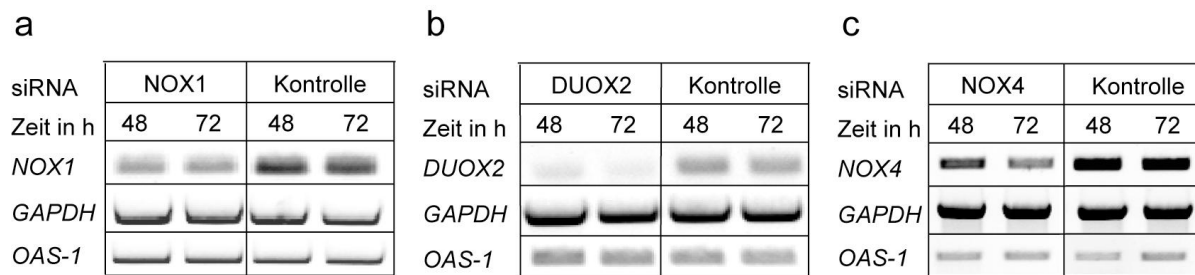
**Abbildung 3-6: Einfluss von DPI auf die NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8 Sekretion.**

cDCF-Assay in NOD2-transfizierten HEK-293 Zellen (a). Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von DPI-vorbehandelten und MDP-stimulierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=6; \*, p<0,05). ELISA der NOD2-abhängigen IL-8-Sekretion in HEK-293 Zellen (b). Die Zellen wurden mit 25  $\mu$ M DPI oder Medium inkubiert und mit 10  $\mu$ g/ml MDP für 12 h stimuliert (Mittelwert  $\pm$  S.D, n=3; \*, p<0,05).

### 3.1.5 siRNA-vermittelter NOX1-, NOX4- oder DUOX2-knockdown

Um zu prüfen, ob NADPH-Oxidasen die enzymatische Quelle der NOD2-vermittelten ROS sind, wurde die Genexpression der NADPH-Oxidasen mittels RNA-Interferenz herunterreguliert.

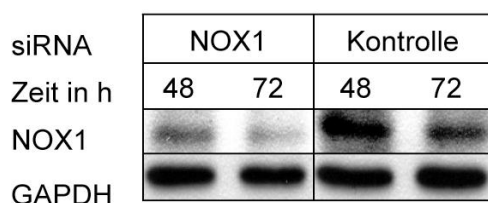
Zunächst wurde die Effizienz des *gene-silencings* überprüft. Wie die Abbildung 3-7 zeigt, waren 48 und 72 Stunden nach siRNA-Transfektion die mRNA-Level von NOX1 und DUOX2 in Caco-2 Zellen reduziert. Ebenfalls verringert war der NOX4 mRNA-Gehalt in HEK-293 Zellen nach 72-stündiger Inkubation.



**Abbildung 3-7: siRNA-vermitteltes gene-silencing von NOX1, DUOX2 und NOX4.**

RT-PCR, 48 und 72 Stunden nach siRNA-Transfektion. Caco-2 (a, b) oder HEK-293 (c) Zellen wurden mit einem Gemisch aus drei verschiedenen, genspezifischen siRNAs mit einer Endkonzentration von 10 nM gegen NOX1 (a), DUOX2 (b) oder NOX4 (c) inkubiert. Unspezifische *off-target* Effekte wurden durch die Abwesenheit der OAS-1 (2',5'-Oligoadenylat-Synthetase-1) Induktion überprüft.

Auf Proteinebene (Abbildung 3-8) wurde der *knockdown* des NOX1 Proteins in Caco-2 Zellen 48 und 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mittels Western-Blot nachgewiesen.



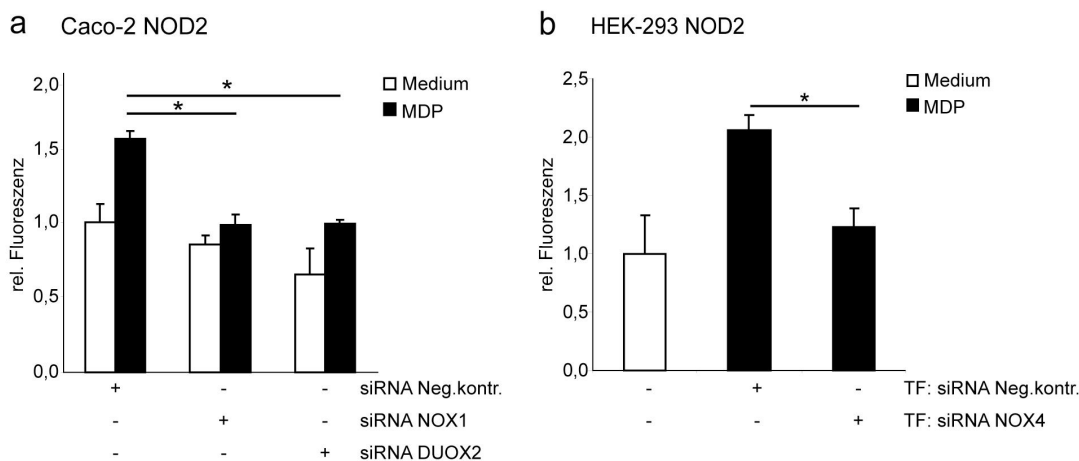
**Abbildung 3-8: siRNA-vermitteltes gene-silencing von NOX1.**

Western-Blot von Proteinlysaten aus Caco-2 Zellen. Die Zellen wurden mit einem Gemisch aus drei verschiedenen, genspezifischen siRNAs mit einer Endkonzentration von 10 nM gegen NOX1 sowie einer Negativkontrolle transfiziert. Der *knockdown* auf Proteinebene wurde 48 und 72 Stunden später mittels Westernblot nachgewiesen.

### 3.1.6 Eine Verminderung von NOX-Enzymen führt zu einer verringerten NOD2-abhängigen ROS-Produktion

Die funktionellen Konsequenzen des NOX-*gene-silencings* auf die NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8-Sekretion wurde in Caco-2 und HEK-293 Zellen untersucht und sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

In NOD2-transfizierten und mit NOX1 und DUOX2 siRNA-behandelten Caco-2 Zellen wurde nach MDP-Stimulation eine signifikant verminderte ROS-Entstehung gemessen. Der NOX4-*knockdown* war mit einer erniedrigten intrazellulären ROS-Entstehung nach Stimulation mit MDP in HEK-NOD2 Zellen verbunden.

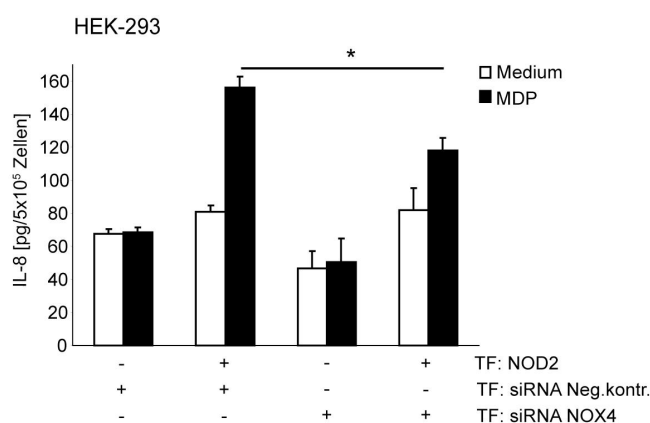


**Abbildung 3-9: siRNA-vermittelte Effekte auf die NOD2-abhängige ROS-Produktion in Caco-2 Zellen.**

CDCF Assay in NOD2-transfizierten Caco-2 (a) und HEK-293 Zellen (b). Die Zellen wurden entweder mit 10 nM NOX1, NOX4 oder DUOX2 siRNA (jeweils ein Gemisch von drei verschiedenen, genspezifischen siRNAs) oder einer siRNA Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden mit 15  $\mu$ M cDCF inkubiert und mit 10  $\mu$ g/ml MDP stimuliert. ROS wurden mittels cDCF-Assay nachgewiesen. Gezeigt ist die Zunahme der relativen Fluoreszenz von MDP-stimulierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=6; \*, p<0,05).

### 3.1.7 NOX4-knockdown reduziert die NOD2-abhängige IL-8 Sekretion in HEK-293 Zellen

Der RNAi-vermittelte NOX4-knockdown reduzierte die NOD2-abhängige intrazelluläre IL-8-Sekretion (siehe Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10: NOX4-siRNA-vermittelte Effekte auf die NOD2-abhängige IL-8-Sekretion in HEK-293 Zellen.**

IL-8 ELISA in HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit 10 nM eines siRNA-Gemisches von drei verschiedenen, spezifischen NOX4-siRNAs oder 10 nM einer siRNA Kontrolle, sowie NOD2 oder einem Leervektor transfiziert. Die Mediumüberstände der Zellen wurden nach 12-stündiger MDP-Stimulation abgenommen und die IL-8-Konzentration bestimmt (Mittelwert  $\pm$  S.D; n=3; \*, p<0,05).

### 3.2 Rolle von Rac1 bei der NOD2-vermittelten Signaltransduktion

Die kleine GTPase Rac1 stellt einen essentiellen Kofaktor zur Aktivierung von NOX1 und NOX2 dar, während die Rolle von Rac1 für die NOX4-Aktivierung ungeklärt ist (s. Einleitung und Diskussion).

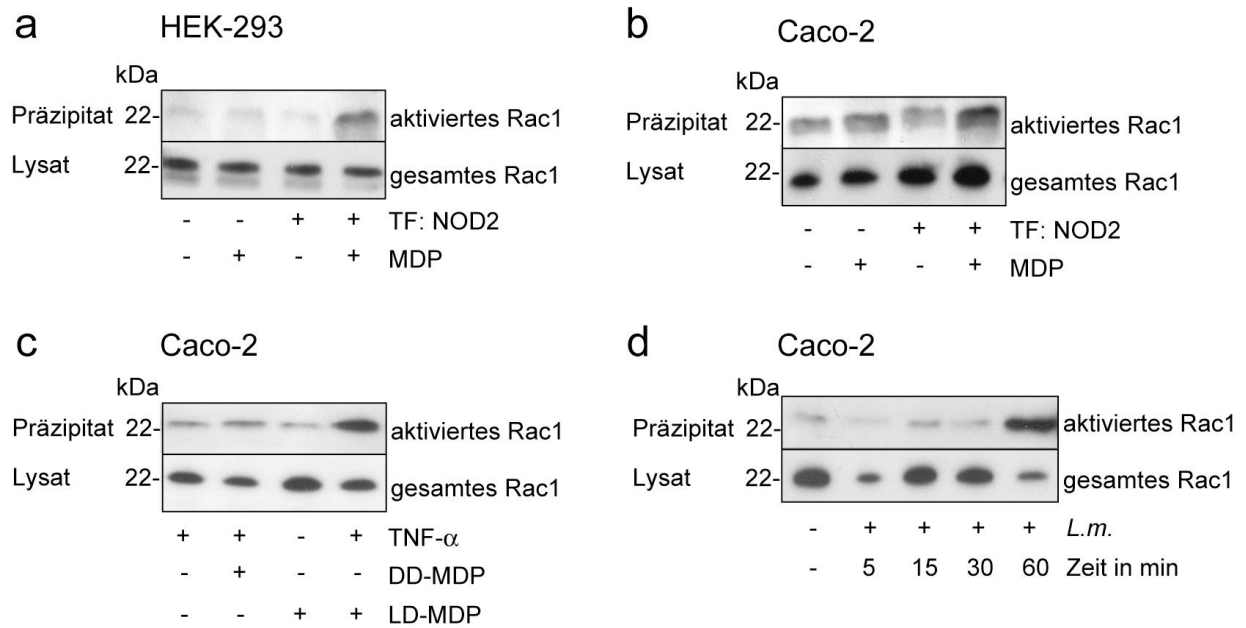
Um den Einfluss von Rac1 auf die NOD2-vermittelte ROS-Produktion aufzuklären, wurden die MDP-abhängige Rac1-Aktivierung sowie die Auswirkungen der Überexpression von dominant-negativem Rac1 auf ROS-Entstehung und NF- $\kappa$ B-Aktivierung untersucht.

#### 3.2.1 Rac1 wird durch die Stimulation mit MDP und Infektion mit *Listerien* aktiviert

Der Rac1-Aktivierungsassay wurde in NOD2-transfizierten HEK-293 und Caco-2 Zellen sowie in TNF- $\alpha$  vorstimulierten Caco-2 Zellen durchgeführt. Die Expression von endogenem NOD2 wird durch TNF- $\alpha$  Stimulation erhöht (Rosenstiel *et al.*, 2003). Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ g/ml MDP für 15 min stimuliert oder für unterschiedlich lange Zeiträume mit *Listeria monocytogenes* (MOI=100) infiziert und anschließend lysiert. Aktiviertes Rac1 wurde spezifisch aus dem Lysat präzipitiert und im Western-Blot detektiert.

Wie der Abbildung 3-11 zu entnehmen ist, wurde Rac1 durch MDP-Stimulation in NOD2-transfizierten HEK-293 und Caco-2 Zellen aktiviert. Aktiviertes Rac1 zeigte sich bereits zehn min nach Stimulation mit MDP. Ebenfalls ist die Aktivierung von Rac1 in untransfizierten, jedoch mit TNF- $\alpha$  vorstimulierten Caco-2 Zellen nachzuweisen, wenn diese zusätzlich mit dem spezifischen NOD2-Ligand LD-MDP stimuliert wurden. Keine Rac1-Aktivierung wurde beobachtet, wenn das Stereoisomer DD-MDP verwendet wurde. Ebenso wenig aktivierte die LD-MDP-Zugabe Rac1, wenn die TNF- $\alpha$ -Vorstimulation entfiel.

Die Infektion von Caco-2 Zellen mit *Listeria monocytogenes* aktivierte nach 60 min Rac1, während nach kürzeren Infektionszeiten zwischen 5 und 30 min kein aktiviertes Protein detektiert wurde.



**Abbildung 3-11: Nachweis der MDP- und Listerien-induzierten Rac1-Aktivierung.**

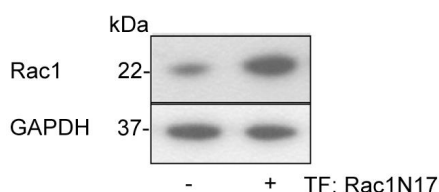
Rac1-Aktivierungsassays nach Stimulation von HEK-293 (a) und Caco-2 Zellen (b-d). Die Zellen wurden mit NOD2 oder einer Vektorkontrolle transfiziert und für 15 min mit 10  $\mu$ g/ml MDP stimuliert (a, b). Alternativ wurden die Zellen für 12 h mit TNF- $\alpha$  vorstimuliert oder unbehandelt gelassen und anschließend mit 10  $\mu$ g/ml des aktiven Stereoisomers LD-MDP, der inaktiven Form DD-MDP oder Medium allein stimuliert (c). Caco-2 Zellen für 5, 15, 30 und 60 min mit *Listeria monocytogenes* infiziert (MOI=100). Aktiviertes Rac1 wurde präzipitiert und mittels Western-Blot nachgewiesen (d).

### 3.2.2 Die Überexpression von inaktivem Rac1N17 vermindert die ROS-Produktion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung

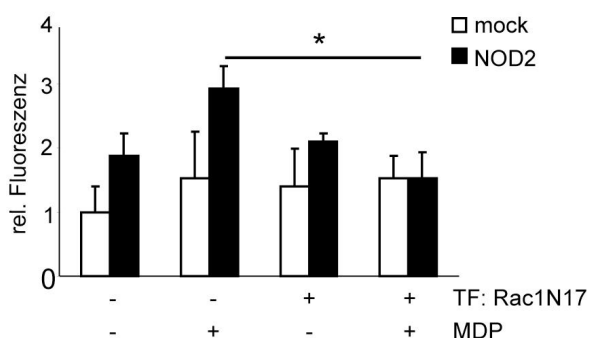
Der Einfluss von Rac1 auf die NOD2-Signalgebung wurde mit Hilfe des inaktiven (dominant-negativen) Rac1N17-Proteins untersucht. Durch den gezielten Austausch von Threonin gegen Asparagin (N) an Position 17 verliert Rac1 seine GTP-Affinität und somit seine Aktivität. Die Überexpression des inaktiven Proteins unterbindet kompetitiv die Bindung des endogenen Rac1-Proteins an GTP.

Die Überexpression von Rac1N17 wurde mittels Western-Blot-Analyse in HEK-293 Zellen bestätigt. Wie weiterhin in Abbildung 3-12 dargestellt, führte die Expression des dominant-negativen Rac1 zu einer verminderten ROS-Produktion in HEK-293 und Caco-2 Zellen. Zwar war in Rac1N17-transfizierten und MDP-stimulierten Caco-2 Zellen eine NOD2-vermittelte ROS-Entstehung zu beobachten, allerdings war diese gegenüber der Kontrolle stark reduziert.

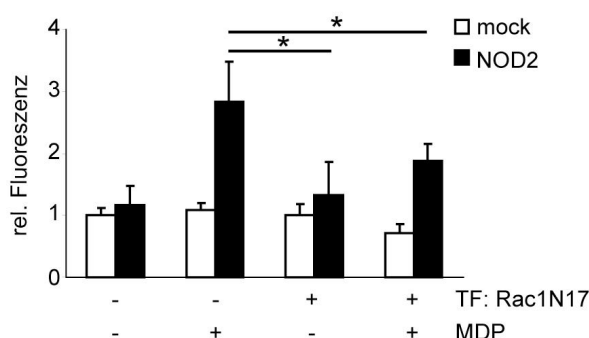
#### a HEK-293



#### b HEK-293



#### c Caco-2

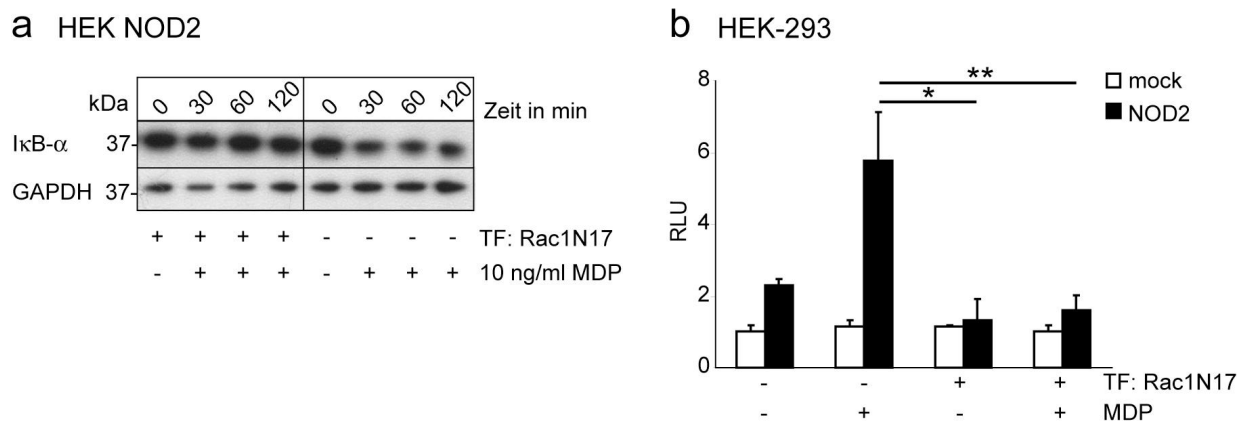


#### Abbildung 3-12. Einfluss von Rac1N17 auf die NOD2-vermittelte ROS-Produktion.

Western-Blot der Rac1N17 Überexpression in HEK-293 Zellen (a). cDCF-Assay in HEK-293 (b) oder Caco-2 Zellen (c), die mit NOD2, Rac1N17 oder Vektorkontrollen transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 15  $\mu$ M cDCF inkubiert und anschließend mit 10  $\mu$ g/ml MDP stimuliert (Mittelwert  $\pm$  S.D.; n=6; \*, p<0,05).



Der Effekt der Rac1N17-Überexpression auf die NOD2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist in Abbildung 3-13 dargestellt. In stabilen HEK-NOD2 Zellen wird die MDP-induzierte I $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradation und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Überexpression von Rac1N17 unterdrückt.



**Abbildung 3-13: Einfluss von Rac1N17 auf die NOD2-vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung.**

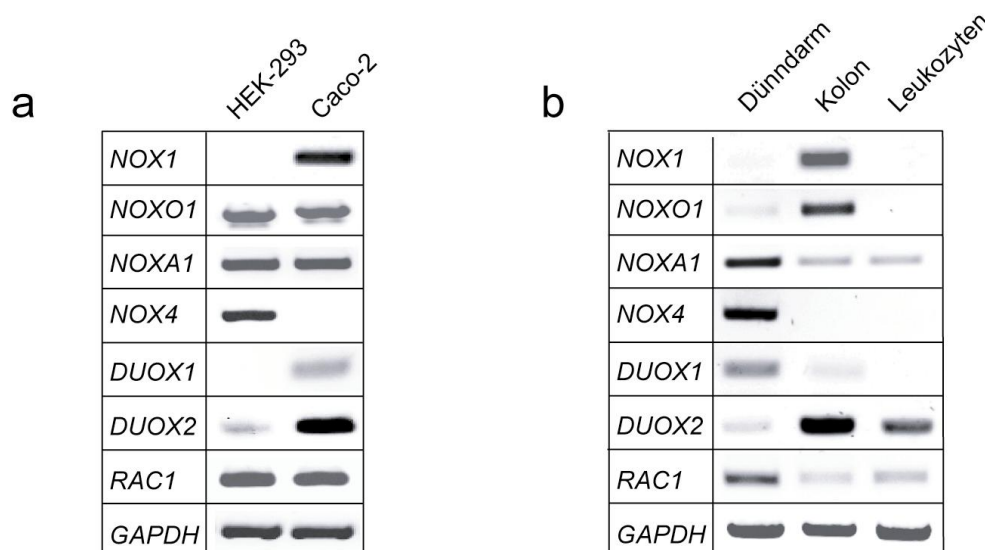
Western-Blot der zeitabhängigen I $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradation (a). Stabile HEK NOD2 Zellen wurden mit Rac1N17 oder einer Vektorkontrolle transfiziert und mit 10  $\mu$ g/ml MDP für unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert. NF- $\kappa$ B Reporter-Gen-Assay (b). HEK-293 Zellen wurden mit einem Luziferase-Reporter-Genkonstrukt, einem pRL-TK Plasmid zur Normalisierung, NOD2, Rac1N17 oder entsprechenden Vektorkontrollen transfiziert. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ g/ml MDP stimuliert oder nur mit Medium behandelt. Die Lumineszenz wurde nach sechsständiger Inkubation ermittelt (Mittelwert der normalisierten Luziferase-Aktivität  $\pm$  S.D; n=3; \*, p<0,05, \*\*, p<0,01).

### 3.3 Expression von NADPH-Oxidasen

Die vorausgegangenen Beobachtungen deuteten auf die Mitglieder der NADPH-Oxidase-Familie als zelluläre Quellen der NOD2-vermittelten ROS-Produktion hin. Um die Rolle dieser Enzymfamilie näher zu beschreiben, wurden einzelne NOX-Vertreter und die regulatorischen Proteine NOXA1, NOXO1 und Rac1 auf ihre Genexpression in intestinalem Gewebe und Leukozyten, den epithelialen Zelllinien HEK-293 und Caco-2, sowie in humanen und murinen Kolonbiopsien untersucht. Studien zur Regulation der Expression unter pro-inflammatorischen Bedingungen wurden in Caco-2, HEK-293 oder Lovo Zellen durchgeführt, zur Expressionsanalyse in unterschiedlichen humanen Geweben wurde ein cDNA-Gewebe Panel verwendet.

#### 3.3.1 Gewebe- und zelltypspezifische Expression

Die Übersicht in Abbildung 3-14 zeigt die Gewebe- und zelltypspezifische Expression von *NOX1*, *NOXO1*, *NOXA1*, *NOX4*, *DUOX1*, *DUOX2* und *RAC1*. Während *NOX4* und *DUOX1* hauptsächlich im Dünndarm exprimiert werden, ist die Expression von *NOX1* und *DUOX2* im Kolon nachzuweisen. Darüber hinaus wird *DUOX2* auch in Leukozyten exprimiert. In HEK-293 Zellen wurden *NOX4* und geringe Mengen *DUOX2* detektiert. Caco-2 Zellen exprimieren *NOX1*, *DUOX1* und *DUOX2*. Die Expression von *RAC1* ist in allen untersuchten Geweben und Zellen nachweisbar. Die Expression des ubiquitär vorkommenden Enzyms GAPDH diente als endogene Kontrolle.

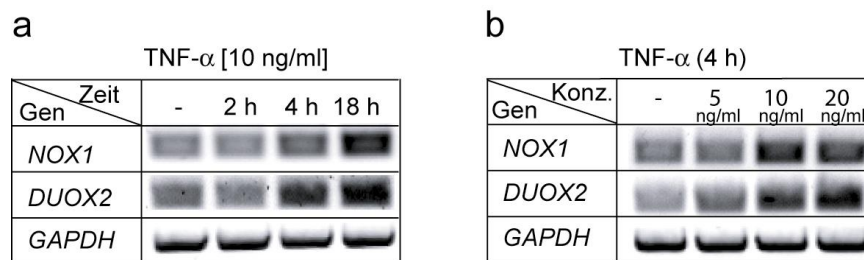


**Abbildung 3-14: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen, NOXO1, NOXA1 und Rac1.**

RT-PCR der gewebe- und zelltypspezifischen Expression von *NOX1*, *NOXO1*, *NOXA1*, *NOX4*, *DUOX1*, *DUOX2* und *RAC1* in Dünndarm, Kolon und Leukozyten (a) sowie in HEK-293 und Caco-2 Zellen (b).

### 3.3.2 Regulation der Expression von *NOX1* und *DUOX2* unter pro-inflammatorischen Bedingungen

Eine zeit- und dosisabhängige Regulation der *NOX1*- und *DUOX2*-Expression durch das pro-inflammatorische Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  wurde in Caco-2 Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3-15). Die Stimulation mit 10 ng/ml  $\text{TNF-}\alpha$  induziert die Expression von *NOX1* und *DUOX2* nach vier und 18 Stunden. Ebenfalls bewirken ansteigende  $\text{TNF-}\alpha$  Konzentrationen von 10 ng/ml und 20 ng/ml eine Induktion der Genexpression nach vierstündiger Inkubationszeit.



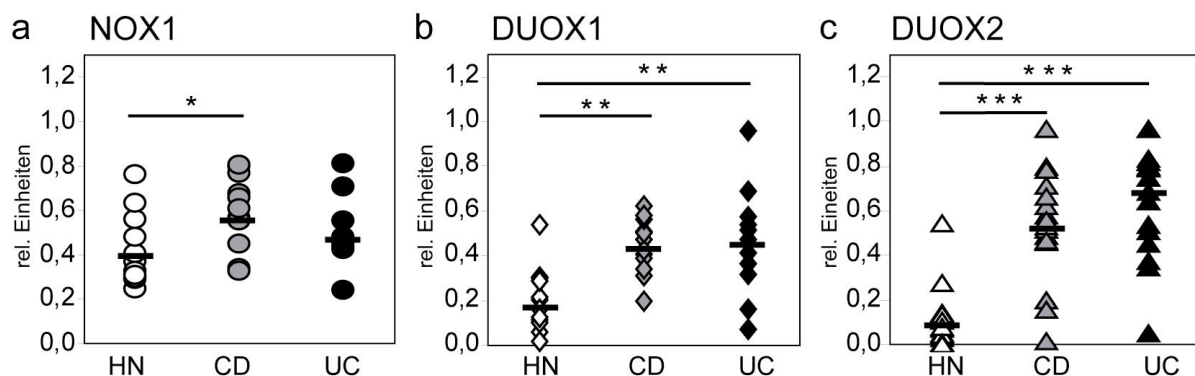
**Abbildung 3-15: Zeit- und dosisabhängige Regulation der *NOX1*- und *DUOX2*-Expression durch  $\text{TNF-}\alpha$ .**

RT-PCR der zeit- und dosisabhängigen *NOX1*- und *DUOX2*-Expression nach  $\text{TNF-}\alpha$  Stimulation in Caco-2 Zellen. Stimulation mit 10 ng/ml  $\text{TNF-}\alpha$  induziert *NOX1* und *DUOX2*-Expression nach vier und 18 Stunden (a). Ansteigende Konzentrationen von  $\text{TNF-}\alpha$  induzieren nach vierstündiger Stimulation die *NOX1*- und *DUOX2*-Expression (b).

### 3.3.3 Expression von *NOX1*, *DUOX1* und *DUOX2* in Kolonbiopsien von CED-Patienten

Die Beobachtung, dass pro-inflammatorische Stimuli die Expression von NOX-Enzymen in intestinalen Epithelzellen erhöhen und die Tatsache, dass chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit oxidativem Stress in den betroffenen Geweben verbunden sind, legte nahe, eine Analyse der *NOX1*, *DUOX1* und *DUOX2*-Expression in Kolonbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa und Probanden ohne Erkrankung durchzuführen.

Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, wird die NADPH-Oxidase *NOX1* in Kolonbiopsien von Morbus Crohn-Patienten vermehrt exprimiert. Eine statistisch hochsignifikant erhöhte Expression sowohl von *DUOX1* als auch von *DUOX2*, ist bei beiden Erkrankungen zu beobachten.

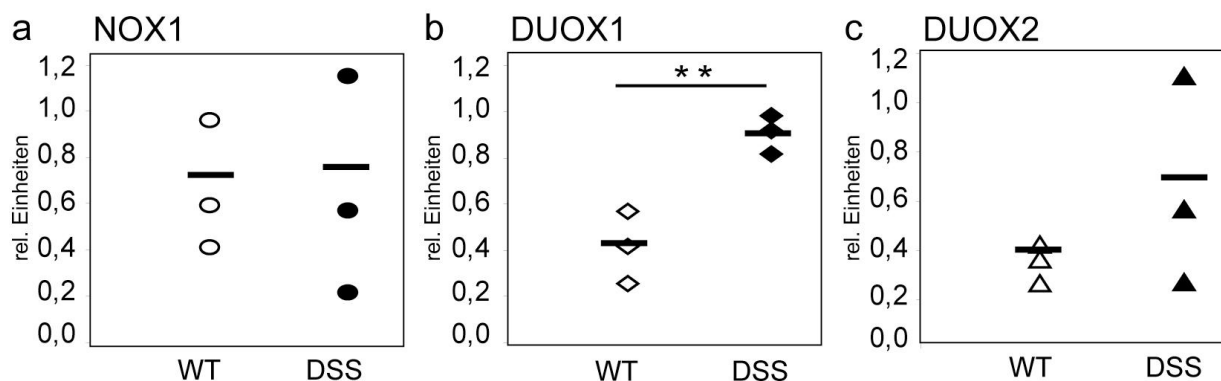


**Abbildung 3-16: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen in Kolonbiopsien von CED-Patienten.**

Densitometrische Auswertung von PCR-basierten Daten zur differentiellen NOX-Expression in humanen Kolonbiopsien. Gesamt-RNA wurde aus Kolonbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn (CD, *Crohn disease*) oder Colitis ulcerosa (UC, *ulcerative colitis*), sowie von gesunden Probanden (HN, *healthy normal individual*) isoliert und zur Synthese von cDNA benutzt. Semiquantitative RT-PCR wurde für *NOX1* (a), *DUOX1* (b) und *DUOX2* (c) durchgeführt, auf die *GAPDH*-Expression normalisiert und die Expression der Zielgene in relativen Einheiten dargestellt (Median, n=12; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001).

### 3.3.4 Expression von *NOX1*, *DUOX1* und *DUOX2* in Kolonbiopsien von Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis

Ein tierexperimentelles CED-Modell ist die mittels Natriumdextransulfat (DSS, *dextran sodium sulfate*) chemisch induzierte Kolitis in Mäusen. Aus entnommenen Gewebeproben der zuvor getöteten C57/BL6/J Mäuse wurde die totale RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *NOX1*, *DUOX1* und *DUOX2* untersucht. Die densitometrische Auswertung in Abbildung 3-17 zeigt einen hochsignifikanten Unterschied (p<0,01) der *DUOX1* Expression zwischen den unbehandelten und DSS-behandelten Mäusen. Ebenfalls erhöht - jedoch nicht statistisch signifikant - war die *DUOX2*-Expression, die zudem im untersuchten Modell eine sehr hohe Streuung aufwies. Die *NOX1*-Expression zeigte keinen Unterschied.

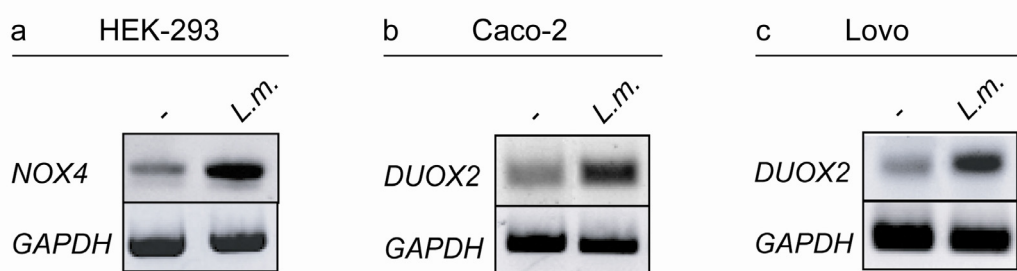


**Abbildung 3-17: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen in Kolonbiopsien von unbehandelten und DSS-behandelten Mäusen.**

Densitometrische Auswertung von PCR-basierten Daten zur differentiellen NOX-Expression aus murinen Dünndarmbiopsien. Die gesamte RNA wurde aus unbehandelten (WT) oder DSS-behandelten Tieren (DSS) isoliert. Die semiquantitative RT-PCR wurde für *NOX1* (a), *DUOX1* (b) und *DUOX2* (c) durchgeführt, auf die *GAPDH*-Expression normalisiert und die Expression der Zielgene in relativen Einheiten dargestellt (Median, n=3; \*\*, p<0,01).

### 3.3.5 Regulation der Expression nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Um den Einfluss einer direkten Infektion epithelialer Zellen auf die NOX-Expression zu analysieren, wurden HEK-293, Caco-2 und Lovo Zellen für eine Stunde mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Die resultierende Induktion der Expression der NADPH-Oxidasen ist in Abbildung 3-18 dargestellt. *NOX4* wurde in HEK-293 Zellen, *DUOX2* in Caco-2 und Lovo Zellen vermehrt exprimiert.



**Abbildung 3-18: Regulation der Expression von *NOX4* und *DUOX2* durch Infektion mit *Listeria monocytogenes*.**

RT-PCR der *NOX4*- und *DUOX2*-Expression in HEK-293 (a), Caco-2 (b) und Lovo (c) Zellen nach einstündiger Infektion mit *Listeria monocytogenes* (L.m., MOI=100). Die Expression von *GAPDH* diente als interne Kontrolle.

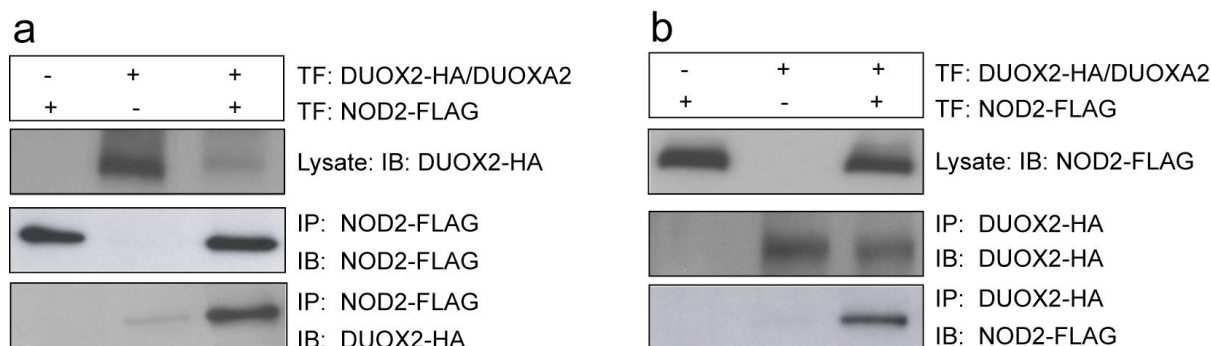
### 3.4 Interaktion zwischen NOD2 und NOX/DUOX

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Frage, ob eine Rac1-unabhängige, direkte Interaktion zwischen NOD2 und den in Caco-2 Zellen exprimierten NADPH-Oxidasen NOX1 und DUOX2 vorliegt. Um diese zu beantworten, wurden Koimmunpräzipitations-Studien durchgeführt und eine mögliche Kolokalisation der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

#### 3.4.1 Koimmunpräzipitation von NOD2 und NOX1/DUOX2

Zunächst wurde eine mögliche direkte Protein-Protein-Interaktion von NOD2 und NOX1 oder DUOX2 mittels Koimmunpräzipitation überprüft. Hierzu wurden HEK-293 Zellen mit Konstrukten für NOD2 und NOX1 oder DUOX2 plus DUOX2-Aktivator (DUOXA2) transfiziert und die resultierenden nativen Proteinlysate biochemisch analysiert.

DUOX2 war in den Immunkomplexen von Flag-NOD2 nachweisbar (Abbildung 3-19 a). Im reziproken Ansatz (bei Präzipitation von HA-markiertem DUOX2) zeigte sich ebenfalls eine Kopräzipitation von HA-DUOX2 und Flag-NOD2 (siehe Abbildung 3-19 b), was die Validität des experimentellen Systems unterstützte. Eine direkte Interaktion von NOD2 und NOX1 konnte durch die Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3-19: Nachweis der Interaktion von NOD2 und DUOX2.**

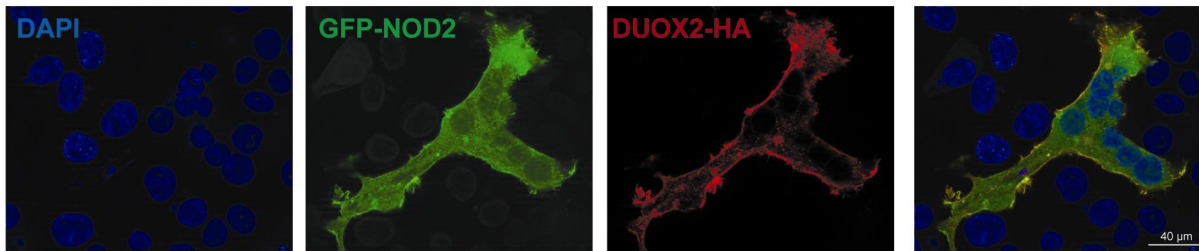
Western-Blot der Lysate und Immunkomplexe von NOD2-FLAG- und DUOX2-HA-transfizierten HEK-293 Zellen. Im Präzipitat wurde mittels Immunblottings NOD2-Flag und kopräzipitiertes DUOX2-HA (a) oder DUOX2-HA und kopräzipitiertes NOD2-FLAG nachgewiesen (b). IP: Immunpräzipitation, IB: Immunblot.



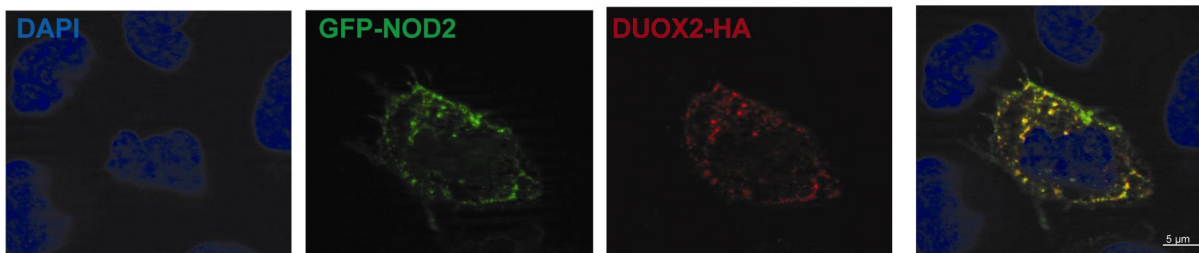
### 3.4.2 Kolokalisation von NOD2 mit DUOX2

Um die subzelluläre Lokalisation von NOD2 und DUOX2 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Die Abbildung 3-20 zeigt die Kolokalisation von NOD2-GFP und DUOX2-HA an der Plasmamembran von HEK-293 und Caco-2 Zellen. Darüber hinaus sind in Caco-2 Zellen, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden, endogene NOD2- und DUOX2-Proteine in Bereichen der bakteriellen Zellinvasion kolokalisiert.

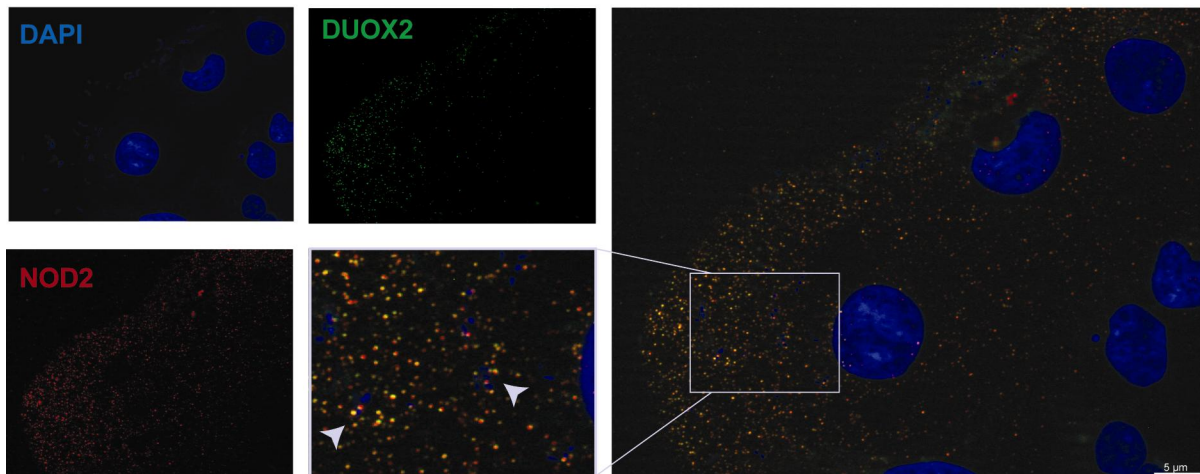
a HEK-293



b Caco-2



c Caco-2



**Abbildung 3-20: Nachweis der Kolokalisation von NOD2 und DUOX2.**

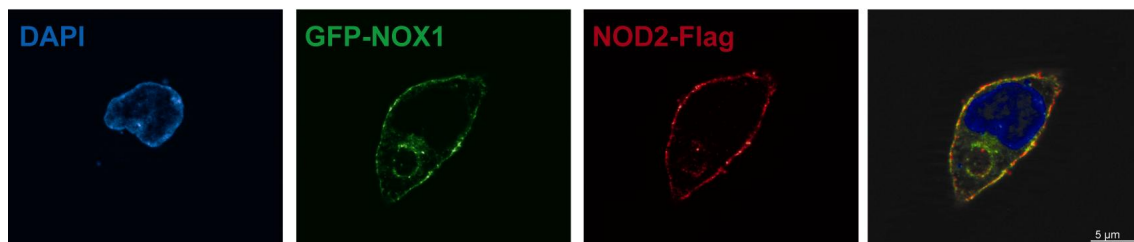
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK-293 (a) und Caco-2 Zellen (b, c). Die Zellen wurden mit GFP-NOD2, DUOX2-HA und DUOX2A2 transfiziert, fixiert, mit Anti-HA (Primär-) und Anti-Maus-Cy3 (Sekundärantikörper) inkubiert und mit DAPI gefärbt (a, b).

Caco-2 Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) vorstimuliert und für eine Stunde mit *Listeria monocytogenes* (MOI=100) infiziert (c). Die fixierten Zellen wurden mit Primärantikörpern gegen endogenes DUOX2 und NOD2, sowie entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert (NOD2: Anti-Kaninchen-Cy3; DUOX2: Anti-Ziege-FITC) und mit DAPI gefärbt. Die weißen Pfeilspitzen markieren Bereiche der bakteriellen Zellinvasion und Kolokalisation von NOD2 und DUOX2.

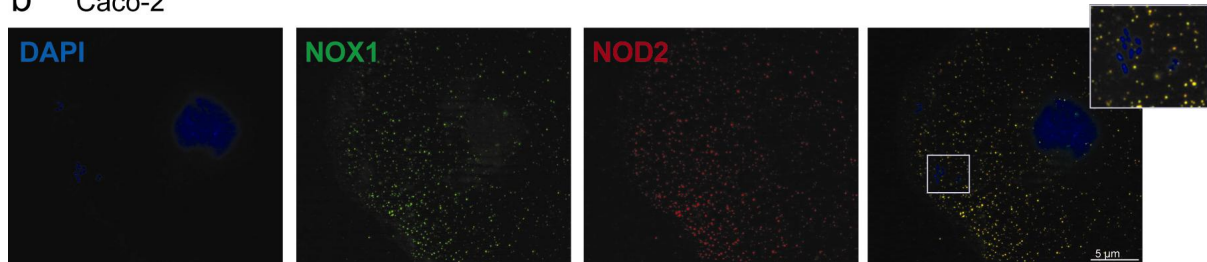
### 3.4.3 Kolokalisation von NOD2 mit NOX1

Um die subzelluläre Lokalisation von NOD2 und NOX1 zu untersuchen, wurden weitere Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Wie in Abbildung 3-21 dargestellt, ist sowohl NOD2-FLAG wie auch NOX1-GFP an der Plasmamembran von transient transfizierten HEK-293 Zellen lokalisiert. Eine schwache Kolokalisation von endogenem NOD2 und NOX1 wurde in Bereichen bakterieller Zellinvasion (*Listeria monocytogenes*) in Caco-2 Zellen festgestellt.

a HEK-293



b Caco-2



**Abbildung 3-21: Nachweis der Kolokalisation von NOD2 und NOX1**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK-293 (a) und Caco-2 Zellen (b).

HEK-293 Zellen wurden mit FLAG-NOD2 und NOX1-GFP transfiziert, fixiert und mit dem Primärantikörper Anti-FLAG und Anti-Maus-Cy3 Sekundärantikörpern inkubiert, sowie mit DAPI gefärbt. Eine Überlagerung dieser Bilder zeigt das rechte Bild (a).

Caco-2 Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  vorstimuliert und für eine Stunde mit *Listeria monocytogenes* (MOI=100) infiziert (b). Die fixierten Zellen wurden mit Primärantikörpern gegen NOX1 und NOD2, sowie entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert (NOD2: Anti-Kaninchen-FITC; NOX1: Anti-Ziege-Cy3) und mit DAPI gefärbt. Eine Überlagerung dieser Bilder zeigt das rechte Bild. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt in das Zytosol eingedrungene Listerien.



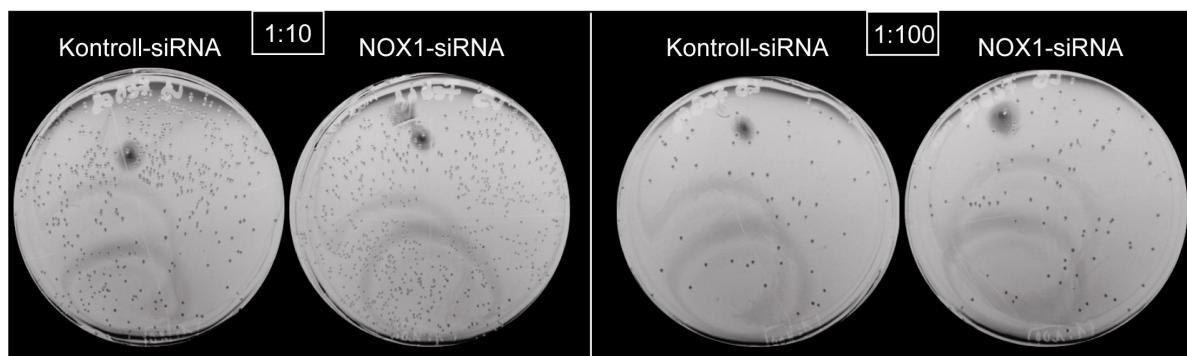
### 3.5 Rolle der NOX-Enzyme für die NOD2-vermittelte epitheliale Barrierefunktion

Um die funktionellen Konsequenzen der Interaktion zwischen NOD2 und DUOX2 zu untersuchen, wurde die NOX-Expression mittels RNA-Interferenz herunterreguliert und ein Zellinvasions-Assay durchgeführt.

#### 3.5.1 NOX1- oder DUOX2-*knockdown* erhöht die bakterielle Zellinvasion

Inwiefern die bakterielle Zellinvasion durch den NOX1- und DUOX2-*knockdown* beeinflusst wird und welche Rolle NOD2-vermittelte Effekte dabei spielen, wurde mit Hilfe des Gentamicin-Protektions-Assays untersucht. Caco-2 Zellen wurden mit NOD2, sowie NOX1- und DUOX2-spezifischer siRNA transfiziert und mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Nach Abtötung der extrazellulären Bakterien mittels Gentamicinbehandlung wurden die Zellen lysiert und ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt.

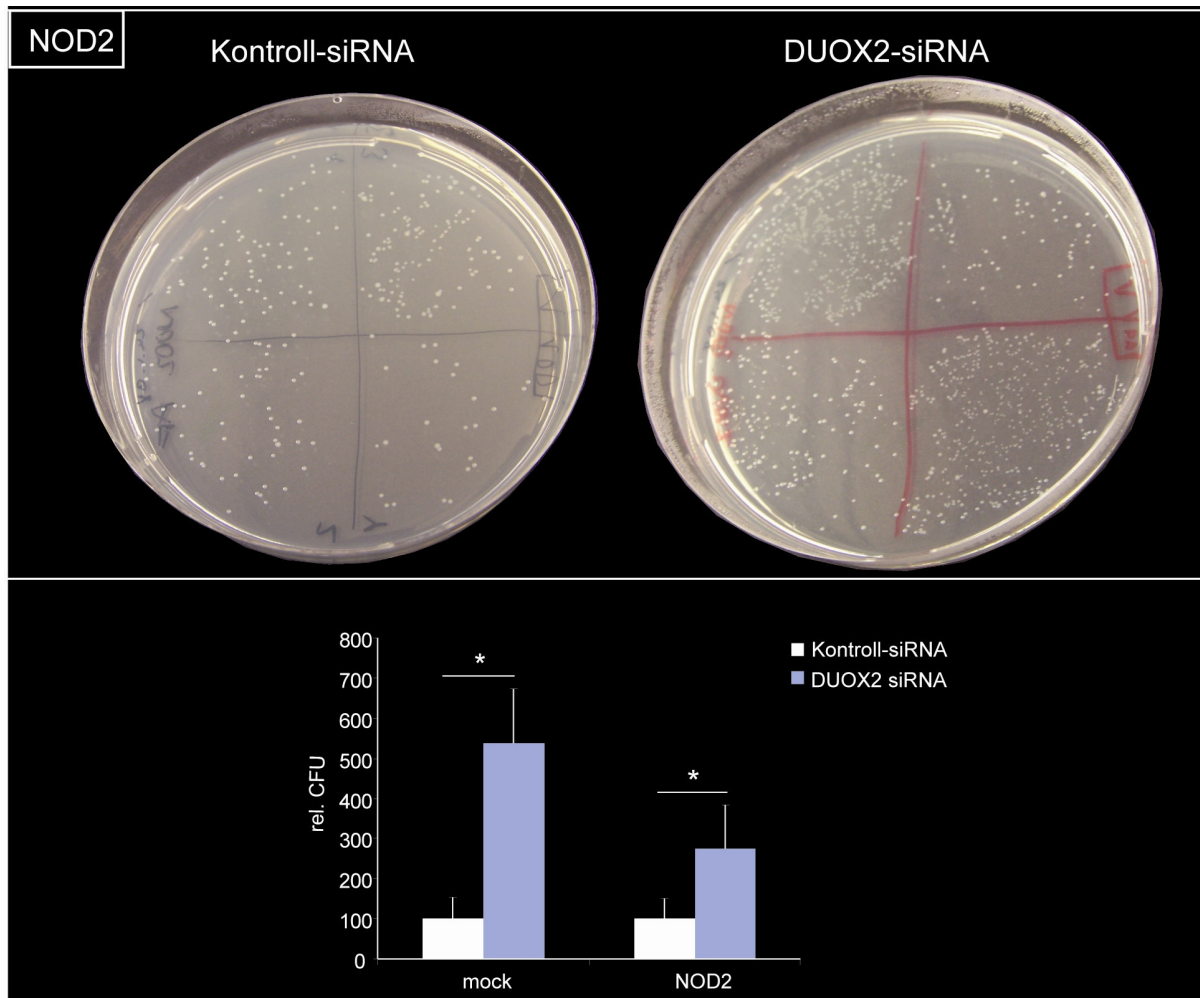
Die Abbildung 3-22 zeigt den Effekt des NOX1-siRNA-vermittelten *knockdowns* in Caco-2 Zellen. Die Anzahl der Kolonie-formenden-Einheiten (CFU, *colony-forming-units*) ist in beiden Verdünnungen gegenüber der Kontroll-siRNA erhöht.



**Abbildung 3-22: NOX1-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion in Caco-2 Zellen.**

Gentamicin-Protektions-Assay. Caco-2 Zellen wurden für 72 Stunden mit 10 nM NOX1-spezifischer siRNA oder einer Negativkontrolle inkubiert. Die Zellen wurden eine Stunde mit dem zytoinvasiven Bakterium *Listeria monocytogenes* (MOI = 100) infiziert und die CFU nach Abtöten der extrazellulären Bakterien und Lyse der Zellen bestimmt.

Wie der Abbildung 3-23 zu entnehmen ist, bestätigte sich dieses Ergebnis auch in Caco-2 Zellen, die mit DUOX2-siRNA behandelt wurden. Der Vergleich der relativen CFU von mock- und NOD2-transfizierten und DUOX2-siRNA behandelten Caco-2 Zellen zeigte einen protektiven NOD2-vermittelten Effekt.



**Abbildung 3-23: DUOX2-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion.**

Gentamicin-Protektions-Assay. Caco-2 Zellen wurden mit NOD2 oder einem Leervektor transfiziert und für 72 Stunden mit 10 nM NOX1- oder DUOX2-spezifischer siRNA oder einer Negativkontrolle inkubiert. Die Zellen wurden eine Stunde mit dem zytoinvasiven Bakterium *Listeria monocytogenes* infiziert und die CFU nach Abtöten der extrazellulären Bakterien und Lyse der Zellen bestimmt. Die dargestellte Verdünnung beträgt 1:100. (Mittelwert ± S.D; n=4; \*, p<0,05).

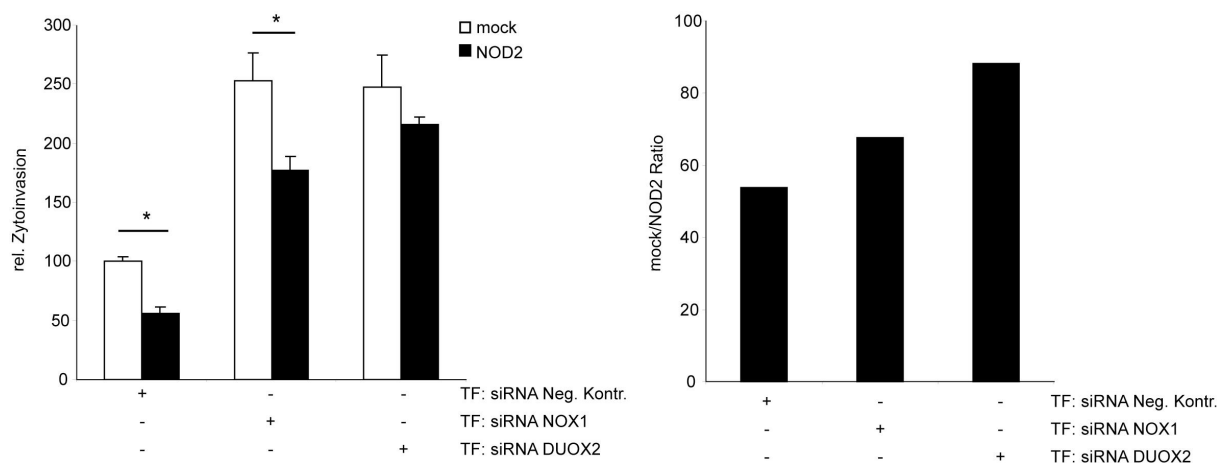
### 3.5.2 NOD2 und DUOX2 wirken antimikrobiell

Die Beobachtungen des Gentamicin-Protektions-Assays wurden mit einem fluoreszenzbasierten Zellinvasions-Assay detaillierter untersucht. Caco-2 Zellen wurden mit CFSE-markierten *Listerien* infiziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die relative Zellinvasion wurde als Produkt aus dem geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität und dem prozentualen Anteil der CFSE-positiven Zellen berechnet.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3-24 dargestellt. In Caco-2 Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, ist die relative Zellinvasion auf 100 % gesetzt. Die gleichzeitige Überexpression von NOD2 bewirkt eine Verminderung der Zellinvasion um ca. 50 % und bestätigt den beobachteten protektiven NOD2-Effekt der Gentamicin-Experimente. Diese prozentuale Verminderung ist als mock/NOD2 Ratio im rechten Diagramm dargestellt

Wurde anstelle der Kontroll-siRNA das NOX1-Gen mittels siRNA herunterreguliert, wiesen die Zellen eine stark erhöhte bakterielle Zellinvasion auf. Die zusätzliche Überexpression von NOD2 bewirkte einen protektiven Effekt, wie dem rechten Diagramm zu entnehmen ist, auch wenn die Zellinvasion gegenüber der Kontroll-siRNA immer noch stark erhöht war.

Der NOD2-Effekt war deutlich vermindert, wenn das DUOX2-Gen herunterreguliert wurde. Insgesamt war die bakterielle Zellinvasion gegenüber der Kontroll-siRNA stark erhöht.

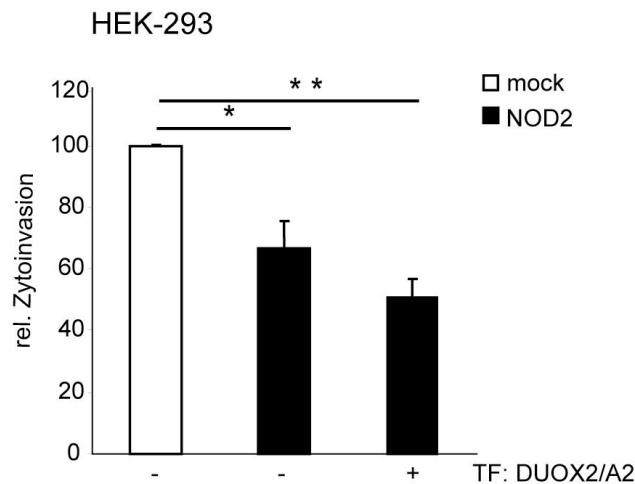


**Abbildung 3-24: NOX1- und DUOX2-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion.**

FACS-Analyse CFSE-markierter Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes* in Caco-2 Zellen. Die Zellen wurden mit NOD2 oder einem Leervektor transfiziert und für 72 Stunden mit 10 nM NOX1- oder DUOX2- spezifischer siRNA oder einer Negativkontrolle inkubiert.

Der Hinweis, dass NOD2 und DUOX2 bei antimikrobiellen Abwehrmechanismen zusammenwirken, wurde im Überexpressions-Versuch in HEK-293 Zellen überprüft.

Die Abbildung 3-25 zeigt den NOD2-vermittelten antimikrobiellen Effekt in mock-transfizierten HEK-293 Zellen. Die Überexpression von NOD2 bewirkte eine verminderte Zellinvasion, die durch die zusätzliche Transfektion von DUOX2 und DUOXA2 weiter vermindert wurde.



**Abbildung 3-25: Effekte von NOD2 und DUOX2 auf die bakterielle Zytotoxikation.**

FACS-Analyse CFSE-markierter Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes* in HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit NOD2 und DUOX2 (plus dem DUOX2 Aktivator DUOXA2) oder einer Vektorkontrolle transfiziert.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass NOX-generierte ROS als Mediatoren und Effektoren der NOD2-Signaltransduktion agieren. Im Rahmen der epithelialen Barriere dienen DUOX2-generierte ROS synergetisch mit NOD2 der antimikrobiellen Abwehr.

## 4 Diskussion

Die NOD2-Signalgebung reguliert die Immunantwort und vermittelt die effektive Abwehr gegenüber Pathogenen an epithelialen Grenzflächen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und ihre funktionelle Bedeutung im Zusammenhang mit der NOD2-Signalgebung zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen eine Verbindung zwischen der NOD2-Signalgebung und Redox-Regulation: Mitglieder der NADPH-Oxidasen generieren NOD2-abhängig ROS, die die NOD2-Signaltransduktion modulieren und direkten Einfluss auf die bakterielle Zellinvasion nehmen.

### 4.1 Kritische Betrachtung der verwendeten Zelllinien und Reagenzien

In dieser Arbeit dienten die epitheliale Zelllinie HEK-293 und die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 als Modellsystem für Signaltransduktions- und Interaktionsstudien. Um die *in vivo*-Relevanz der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Kernaussagen der Experimente soweit möglich im murinen Modell oder mit humanen Biopsieproben verifiziert.

Studien zur gewebe- und zelltyp-spezifischen Expression von NADPH-Oxidasen haben Caco-2 Zellen als geeignetes Modell für das Kolonepithel ausgewiesen. Sowohl Kolongewebe wie auch Caco-2 Zellen exprimieren die NADPH-Oxidasen NOX1 und DUOX2. Daher wurden Caco-2 Zellen als Modell für bakterielle Invasionsstudien verwendet. HEK-293 Zellen, die über kein endogenes NOD2 verfügen, wurden für Überexpressionsstudien eingesetzt. Die ROS-Produktion, die in diesen Zellen beobachtet wird, ist auf NOX4 zurückzuführen, das von HEK-293 Zellen endogen exprimiert wird.

Der in dieser Arbeit häufig verwendete redoxensitive Farbstoff cDCF-DA oxidiert leicht und unspezifisch. Um Artefakte auszuschließen, wurden die Messbedingungen und die Datenauswertung in Vorversuchen optimiert. Als Positivkontrolle wurden zum einen  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ansteigenden Konzentrationen (0,1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) zu den Zellen hinzugegeben und zum anderen die Zellen mit dem Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  stimuliert, welches ROS als Bestandteil der  $\text{TNF-}\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion induziert (Remacle *et al.*, 1995). Die Daten wurden ausgewertet, indem die Steigung der Regressionsgeraden zwischen Ausgangs-Fluoreszenz und der Fluoreszenz nach einem bestimmten Zeitpunkt berechnet und mit den anderen Steigungswerten verglichen wurde. Insgesamt wurde darauf geachtet, nur konfluente, homogen gewachsene Zellen für die ROS-Messungen zu verwenden.

Um den Einfluss von ROS auf die NOD2-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu untersuchen, wurden unter anderem Antioxidantien eingesetzt. Die Verbindungen L-(+)-Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Selenomethionin, (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und Resveratrol wurden aus unterschiedlichen Substanzklassen gewählt, um ein breites Spektrum antioxidativer Verbindungen abzudecken. Nicht auszuschließen bleibt, dass sie auch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch andere, redoxunabhängige Mechanismen beeinflussen.

## 4.2 Modulation der NOD2-Signalgebung durch ROS

### 4.2.1 ROS als Mediatoren der NOD2-Signalgebung

Die Stimulation mit MDP induziert in NOD2-transfizierten Epithelzellen reaktive Sauerstoffspezies. Mit diesem Ergebnis übereinstimmend ist die verminderte ROS-Produktion in murinen Kolonepithelzellen NOD2-defizienter Mäuse.

Interessanterweise wurde bereits 1985 die Freisetzung von Superoxid nach Stimulation mit Muramyl-Peptiden in murinen Makrophagen und peritonealen Zellen beobachtet (Silverman *et al.*, 1985). Erst kürzlich hingegen wurden ROS als Mediatoren der Signalgebung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems identifiziert. Darunter sind die Toll-like-Rezeptoren TLR2 (Shin *et al.*, 2008), TLR4 (Asehnoune *et al.*, 2004), TLR5 (Kawahara *et al.*, 2004a), TLR9 (Lee *et al.*, 2008a) sowie die NOD-like-Rezeptoren NLRX1 (Tattoli *et al.*, 2008) und NALP3 (Dostert *et al.*, 2008). Die entstehenden ROS beeinflussen die rezeptorvermittelte Signalgebung, wie den NF- $\kappa$ B- oder JNK-Signalweg (Ryan *et al.*, 2004; Tattoli *et al.*, 2008).

Dieser modulierende Effekt der ROS bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit für die NOD2-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung und IL-8-Sekretion. In HEK-293 Zellen führte der pharmakologische NOX-Inhibitor DPI sowie das NOX4-*Gene-silencing* zu einer verminderten IL-8-Sekretion. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird durch die Antioxidantien L-(+)-Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Selenomethionin, (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und Resveratrol vermindert. Vergleichbar hiermit mindert Selen die LPS-induzierte ROS- und NO-Produktion in murinen Makrophagen (Kim *et al.*, 2004) und unterdrückt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TLR3- und TLR4-Agonisten (Youn *et al.*, 2008). Ascorbat und  $\alpha$ -Tocopherol inhibieren nach Zugabe pro-inflammatorischer Stimuli sowohl die ROS-Entstehung wie auch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in humanen dendritischen Zellen (Tan *et al.*, 2005). Für die polyphenolischen Verbindungen Resveratrol und EGCG ist eine zelltyp- und stimulus-abhängige Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beschrieben (Kundu *et al.*, 2006; Kundu und Surh, 2007; Rahman *et al.*, 2006). Gezeigt wurde ferner, dass EGCG die I $\kappa$ B-Kinase-Aktivität in intestinalen Epithelzellen inhibiert (Yang *et al.*, 2001).

#### 4.2.2 Die Rolle von NOX-Enzymen und Rac1 für die NOD2-vermittelte ROS-Produktion

Als subzellulärer Ursprung der NOD2-induzierten ROS wurden Vertreter der NADPH-Oxidasen (NOX)-Enzymfamilie identifiziert. In ähnlicher Weise ist NOX4 an der TLR4-induzierten ROS-Produktion in HEK-293 Zellen beteiligt (Park *et al.*, 2004). Die Flagellin-induzierte TLR5-Signalgebung aktiviert NOX1 in Kolonzellen (Kawahara *et al.*, 2004b). Darüber hinaus sind NADPH-Oxidasen an der ROS-vermittelten Aktivierung des NALP3-Inflammasoms beteiligt (Dostert *et al.*, 2008).

Die GTPase Rac1 wurde hinsichtlich ihrer Rolle als molekulares Bindeglied zwischen NOD2 und den NADPH-Oxidasen untersucht. Rac1 aktiviert den NOX1-Aktivator NOXA1 und beeinflusst so die NOX1-Aktivierung. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität von DUOX2 unabhängig von Rac1 (Bedard und Krause, 2007). Wie die Ergebnisse zeigen, aktiviert die Stimulation mit MDP Rac1 in HEK-293 und Caco-2 Zellen. Die Expression von dominant-negativem Rac1 führt zu einer verminderten ROS-Produktion in HEK-293 und Caco-2 Zellen. Diese Befunde zeigen, dass die NOD2-induzierte ROS-Produktion in epithelialen Zellen wahrscheinlich über Rac1 vermittelt wird.

Diese Ergebnisse stimmen mit der kürzlich gezeigten Rac1-Aktivierung nach MDP-Stimulation in THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten überein (Eitel *et al.*, 2008). Darüber hinaus zeigt die Studie eine erhöhte MDP-abhängige IL-8-Sekretion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Inhibierung von Rac1. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Überexpression von Rac1N17 die MDP-induzierte I $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradation und NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK-293 Zellen reduzierte. Möglicherweise reflektieren diese gegensätzlichen Befunde die zelltyp-spezifische Expression und die damit verbundenen potenziellen funktionellen Unterschiede der NOX-Enzyme. In Monozyten und THP-1 Zellen wird hauptsächlich NOX2 exprimiert. Die von diesem Enzymsystem im Rahmen des oxidativen *Bursts* induzierten ROS wirken bakterizid. Für NOX4 und NOX1 hingegen wurde die Produktion moderater ROS-Konzentrationen beschrieben, die das intrazelluläre Signalgeschehen modifizieren (Bedard und Krause, 2007).

Die Studie von Eitel *et al.* zeigt ferner eine Rac-1 vermittelte Rekrutierung von NOD2 an die Zellmembran. Eine weitere Arbeit dokumentiert ebenfalls die Lokalisation von NOD2 und aktiviertem Rac1 in *membrane ruffles* (Membran-Ausstülpungen) und die Interaktion von endogenem NOD2 und Rac1 in HT-29 Zellen (Legrand-Poels *et al.*, 2007). Obwohl erste Studien NOD2 als zytosolisches Protein beschrieben, zeigen aktuelle Arbeiten die Interaktion von NOD2 mit Membran-gebundenen Proteinen. So ist die Rekrutierung von NOD2 an die Zellmembran eine Voraussetzung für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen (Barnich *et al.*, 2005a). Weiterhin resultiert aus der Interaktion von NOD2 mit dem Membranprotein CD147 eine erhöhte Kapazität, auf bakterielle Zellinvasion zu reagieren (Till *et al.*, 2008).

In Übereinstimmung mit den beschriebenen Studien wurde in dieser Arbeit eine Membran-Lokalisation von NOD2 beobachtet. Möglicherweise bewirkt die MDP-induzierte Rac1-Aktivierung, neben der Aktivierung von NOX-Enzymen, die Translokation von NOD2 an die Membran. Zudem bleibt unklar, ob die Interaktion von NOD2 und DUOX2 direkt oder Rac1-vermittelt ist. Die Aufklärung dieser Prozesse ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

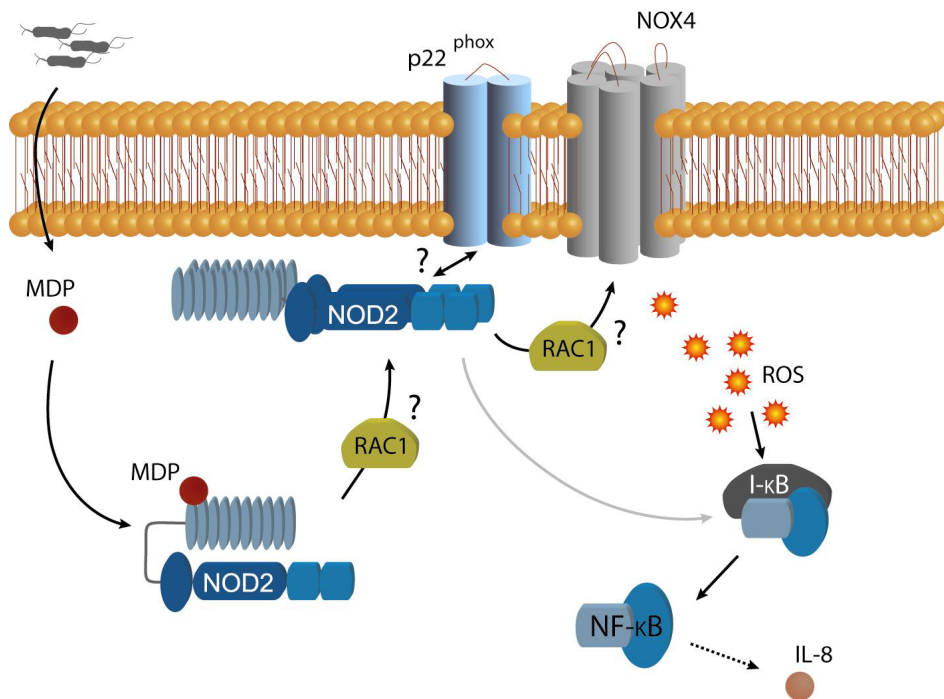
Interessanterweise wurden weitere Interaktionen zwischen NOX-assoziierten Proteinen und NOD2 in Epithelzellen gezeigt: Die Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup> interagieren mit NOD2, wie Daten von *yeast-two-hybrid* Experimenten zeigen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Die p22<sup>phox</sup>-Untereinheit ist mit NOX1 und NOX4 assoziiert (Ambasta *et al.*, 2004) und die regulatorische Untereinheit p47<sup>phox</sup> ist an der Aktivierung von NOX2 beteiligt (De Leo *et al.*, 1996). Bemerkenswert ist, dass NOXO1 ein p47<sup>phox</sup>-Homolog darstellt, welches an der NOX1-Aktivierung mitwirkt (Geiszt *et al.*, 2003a) und somit ein weiteres molekulares Bindeglied zwischen NOX1 und NOD2 darstellen könnte.

Die Lokalisation von NOX-Enzymen und assoziierten Untereinheiten sowie von Rac1 wurde in *membrane ruffles* und *lipid rafts* (cholesterinreichen Mikrodomänen der Zellmembran) gezeigt (Shao *et al.*, 2003; Ushio-Fukai, 2006). In diesen Mikrodomänen erfolgen die Rekrutierung der zytosolischen NADPH-Oxidase-Faktoren und die Assemblierung der aktiven NADPH-Oxidase (Vilhardt und van Deurs, 2004). Generell wird angenommen, dass in den *lipid rafts* Rezeptor- und Signalmoleküle aggregieren und diese hohe Rezeptordichte die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen ermöglicht. Die *lipid rafts* bilden somit eine Signalplattform, in der das Signal weitergeleitet oder amplifiziert wird (Shao *et al.*, 2003). Interessanterweise sind *lipid rafts* Plattformen der Redox-Signalgebung in Verbindung mit Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTPs, siehe Abbildung 4-4) (Li und Gulbins, 2007). Die LMW-PTP (*Low-molecular-weight-PTP*) interagiert mit Caveolin-1, dem Hauptstrukturprotein der *lipid rafts* (Caselli *et al.*, 2007). Weiterhin zeigten Lee und Kollegen, dass NOX4-abhängig generierte ROS über IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) induziert werden und über LMW-PTPs den JAK-STAT-Signalweg modulieren (Lee *et al.*, 2007).

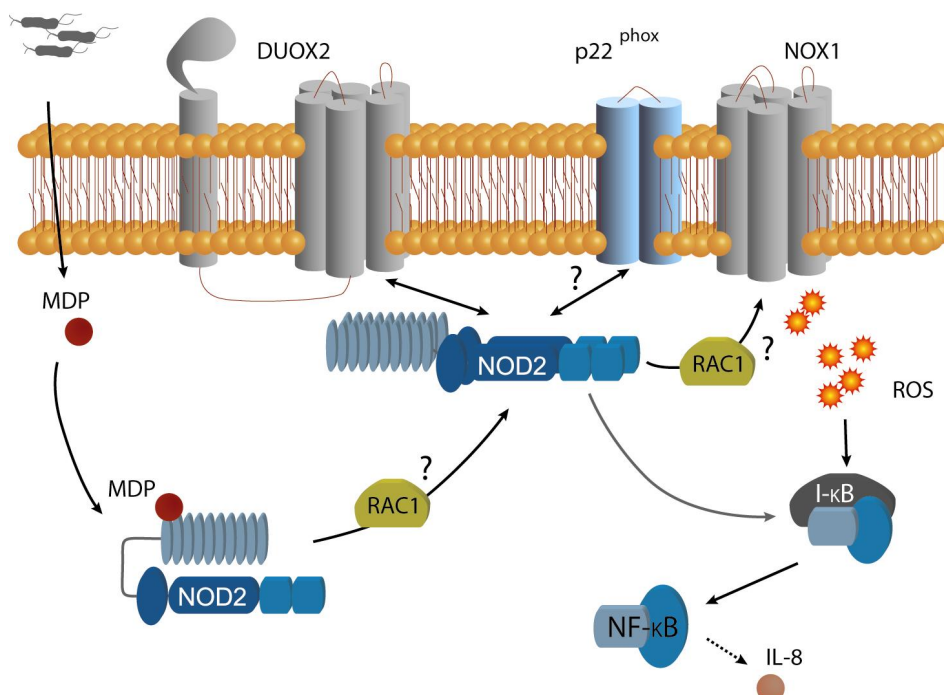
In Analogie hierzu ist es denkbar, dass NOD2 nach MDP-Stimulation oligomerisiert und an die Plasmamembran rekrutiert wird. Dieser Schritt erfolgt möglicherweise abhängig von Rac1. Nach diesem Modell induziert die Interaktion von NOD2 mit NOX-Enzymen oder assoziierter Faktoren in Bereichen der *lipid rafts* ROS, welche wiederum redoxsensitive Faktoren mit Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg modifizieren.



## HEK-293



## Caco-2



**Abbildung 4-1: Hypothetisches Schema der NOD2-vermittelten ROS-Produktion durch NOX4 in HEK-293 Zellen (oben) und NOX1 und DUOX2 in Caco-2 Zellen (unten).**

Die Anwesenheit von Muramyl-Dipeptid (MDP) im Zytosol der Zelle aktiviert NOD2. Möglicherweise bewirkt Rac1 eine Translokation von NOD2 an die Zellmembran und/oder vermittelt die Aktivierung von NADPH-Oxidasen. Daneben führt die direkte Interaktion von NOD2 und DUOX2 ebenfalls zur Aktivierung des Enzyms. In der Folge werden ROS produziert, die Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion nehmen.

### 4.3 Die Rolle der NADPH-Oxidasen für die epitheliale Barriere

Von Bedeutung für die bakterielle Zellinvasion sind die *lipid rafts*. Um in Epithelzellen einzudringen, nutzen Listerien diese cholesterinreichen Bereiche der Plasmamembran aus, wie mehrere Arbeitsgruppen zeigten (Duncan *et al.*, 2004; Lafont und van der Goot, 2005). An der Interaktion, Bindung und dem Eintritt der Bakterien sind unter anderem die Caveolin-Proteine, E-Cadherin und HGF-R (*hepatocyte growth factor-receptor*) beteiligt (Abraham *et al.*, 2005; Seveau *et al.*, 2004). Die Listerien-eigenen Invasionsproteine Internalin A und Internalin B binden an den E-Cadherin- bzw. HGF-Rezeptor der Wirtszelle und initiieren so eine Signalkaskade, die eine Umgestaltung des Zytoskeletts bewirkt und für eine Aufnahme der Bakterien in das Zellinnere sorgt. Die Anwesenheit dieser beiden Rezeptoren in den *lipid rafts* ist für den Invasionsprozess erforderlich (Seveau *et al.*, 2004). Auch die durch Listerien induzierte Rac1-Aktivierung ist von Cholesterin abhängig (Seveau *et al.*, 2007).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, induziert die Infektion von Caco-2 Zellen mit Listerien ebenfalls die Aktivierung von Rac1. Darüber hinaus wurden Listerien-Cluster in infizierter Caco-2 Zellen nachgewiesen. In diesen Bereichen sind ebenfalls endogenes NOD2 und DUOX2 sowie NOD2 und NOX1 kolokalisiert. Betrachtet man die Lokalisation von NOD2 und NOX-Enzymen in *lipid rafts*, so dient ihre Interaktion neben der Signalgebung vermutlich der gezielten Abwehr von Pathogenen. Die Freisetzung von ROS wirkt dabei der Invasion von Listerien entgegen.

Diese Hypothese wird durch die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit gestützt: Invasions-Studien mit *Listeria monocytogenes* zeigten, dass der RNAi-vermittelte *knockdown* sowohl von NOX1 wie auch von DUOX2, den bakteriellen Eintritt in die Zelle erhöht. Dies lässt auf eine ROS-Produktion durch beide Oxidasen schließen, deren antimikrobielle Funktion den Eintritt von Bakterien in die Zelle begrenzt. Die Überexpression von NOD2 wirkt protektiv. Dieser Effekt von NOD2 ist in NOX1-defizienten, nicht aber in DUOX2-defizienten Zellen nachweisbar.

Überexpressionsstudien in HEK-293 Zellen bestätigen die protektive Wirkung von NOD2, darüber hinaus verstärkt die zusätzliche Überexpression von DUOX2 diesen Effekt. Zusammen implizieren diese Beobachtungen eine synergetische Funktion von NOD2 und DUOX2, die in einer antimikrobiellen Wirkung resultiert.

Bekannt ist bisher, dass die protektive Wirkung von NOD2 auf der Freisetzung antimikrobieller Peptide beruht (Voss *et al.*, 2006). Daneben ist die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie dem Neutrophilen-Aktivator IL-8, Bestandteil der NOD2-induzierten Immunantwort. Die Interaktion von NOD2 und DUOX2 stellt einen neuen Mechanismus der NOD2-vermittelten Immunität in intestinalen Epithelzellen dar. Die schnelle Synthese von DUOX2-generierten ROS erlaubt eine unmittelbare Reaktion auf die bakterielle Invasion, unabhängig von der Induktion der Genexpression.

Die Rolle von DUOX2 wird durch die Expression des Enzyms in anderen Barriereorganen verdeutlicht. In Epithelzellen der Atemwege wurde die DUOX-vermittelte  $H_2O_2$ -Produktion beschrieben (Forteza *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist in Patienten mit zystischer Fibrose die DUOX-abhängige ROS-Produktion und damit verbundene bakterizide Aktivität vermindert (Moskwa *et al.*, 2007). Keine Verbindung wurde zwischen Polymorphismen von DUOX2 sowie weiteren Komponenten des angeborenen Immunsystems und einer erhöhten Prädisposition für Lungenerkrankungen festgestellt. (Lee *et al.*, 2006). Auch wenn Studien bisher keine Verbindung zu NOD2 ziehen, wird NOD2 generell von Epithelzellen der Barriereorgane, wie auch der Lunge exprimiert (Uehara *et al.*, 2007).

Die Bedeutung der dualen Oxidasen für die Mukosa wird durch eine Publikation von Geiszt und Kollegen gestützt. DUOX1 und DUOX2 liefern als  $H_2O_2$ -Quellen das notwendige Substrat für die Laktoperoxidase. Dieses antimikrobielle Enzym wird von Speicheldrüsen sezerniert und ist im Zusammenspiel mit den dualen Oxidasen ein potenzieller Abwehrmechanismus der Mukosa (Geiszt *et al.*, 2003b). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete DUOX2- und NOX1-vermittelte antimikrobielle Aktivität ist daher neben dem direkten Effekt der ROS womöglich auf das Zusammenwirken mit der Laktoperoxidase zurückzuführen. Allerdings ist unklar, in welchem Umfang – wenn überhaupt – das Enzym von Caco-2 Zellen sezerniert wird. Wahrscheinlicher erscheint daher eine direkte ROS-vermittelte bakterizide Wirkung.

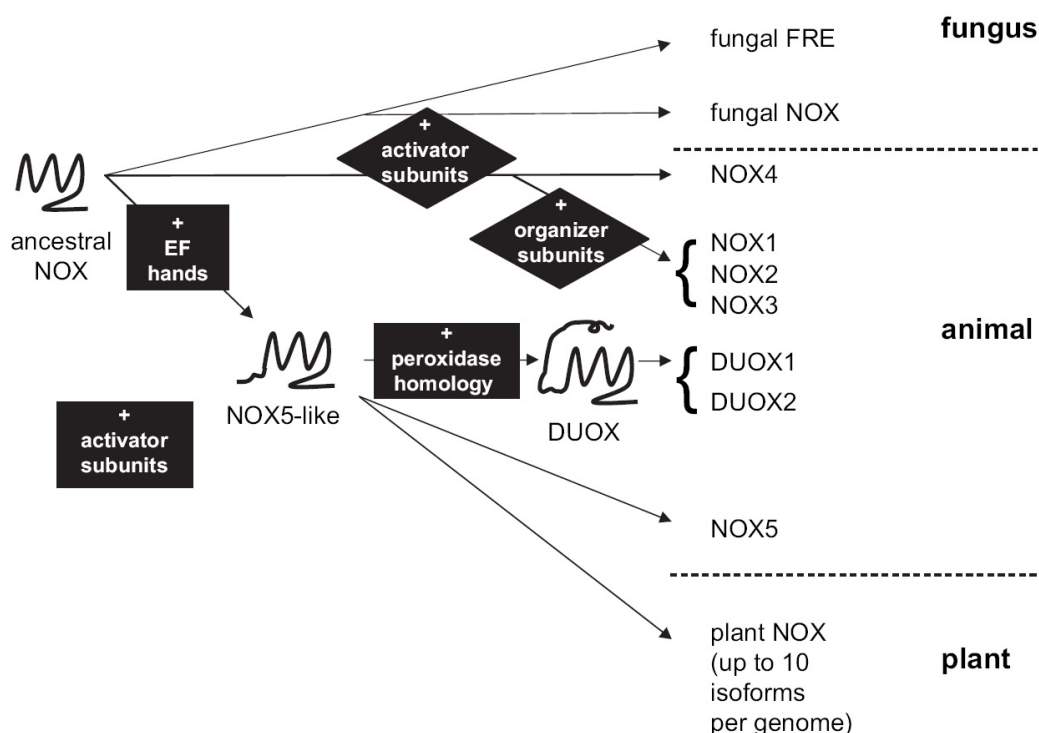
Ein solcher direkter Effekt von ROS wurde in intestinalen Epithelzellen bei *Drosophila* beschrieben. Durch das DUOX2-Ortholog dDUOX2 generierte ROS besitzen eine direkte mikrobizide Wirkung (Ha *et al.*, 2005). Diese Studie zeigte erstmalig, dass die gezielte Freisetzung von antimikrobiell wirksamen ROS nicht auf Phagozyten beschränkt ist, sondern auch als Abwehrmechanismus des Mukosaepithels genutzt wird.

Weitere Arbeiten dieser Gruppe zeigen darüber hinaus den Zusammenhang zur NF- $\kappa$ B-Signalgebung. Um die physiologische Rolle von NF- $\kappa$ B und antimikrobiellen Peptiden (AMP) zu studieren, wurden ROS-resistente Mikroben verfüttert. Nur die NF- $\kappa$ B-defizienten Fliegen, nicht jedoch die Wildtyp-Fliegen sind daraufhin anfällig für intestinale Infektionen. Daraus wurde abgeleitet, dass das intestinale NF- $\kappa$ B/AMP-System als eine Art Sicherungssystem arbeitet, das ergänzend zu der ROS-vermittelten Darm-Immunität während der Infektion mit ROS-resistenten Pathogenen entscheidend ist (Ryu *et al.*, 2006).

Unklar bleibt, inwiefern sich DUOX2 und NOX1, die beide in Caco-2 Zellen exprimiert werden funktionell unterscheiden. Für NOX1 und NOX4, die beide in vaskulären Zellen exprimiert sind, wurde bereits die Produktion unterschiedlicher ROS beschrieben. NOX4 vermittelt eine basale  $H_2O_2$ -Produktion, während NOX1 Superoxid generiert (Dikalov *et al.*, 2008). Möglicherweise bieten diese Befunde einen Erklärungsansatz: analog würde DUOX2  $H_2O_2$  und NOX1 Superoxid produzieren. Vermutlich unterscheidet sich auch der Ort ihrer Freisetzung, denn ROS, die in das Zytoplasma abgegeben werden bewirken andere Effekte als extrazellulär sezernierte ROS.

#### 4.4 Die Bedeutung der evolutionären Konservierung von NLRs und NOX-Enzymen

In der Evolution besaßen Organismen, die erfolgreich Sauerstoff in ihren Stoffwechsel integrieren und ausnutzen konnten, einen entscheidenden Vorteil: Neben der Fähigkeit, Sauerstoff als Elektronenakzeptor für die ATP-Synthese zu verwenden, entwickelten sie Strategien zur Begrenzung der Toxizität von Sauerstoff oder seiner Derivate (ROS) (Bubici *et al.*, 2006). Die ROS-detoxifizierenden Enzyme SOD und Katalase entstanden bereits in Prokaryoten (Kawahara *et al.*, 2007). Mehrzellige Organismen entwickelten außerdem evolutionär konservierte Systeme, um mikrobielle Pathogene abzuwehren. So tauchen Orthologe der NOX/DUOX-Enzyme mit der Entstehung von Eukaryoten auf, was als Indiz ihrer Abwehrfunktion gewertet wird (Lalucque und Silar, 2003).



**Abbildung 4-2: Hypothetisches Schema der Evolution von NOX-Enzymen.**

Die verschiedenen NOX-Enzyme in Pilzen, Tieren und Pflanzen verfügen über einen gemeinsamen Vorläufer. Die pflanzlichen NOX-Homologe ähneln NOX5 und verfügen ebenfalls über eine FAD- und NADPH-Bindestelle, sechs Transmembran-Domänen und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierende Einheit. Modifiziert nach (Bedard *et al.*, 2007).

Ein weiterer evolutionär konservierter Abwehrmechanismus liegt in der zytosolischen Detektion von mikrobiellen molekularen Mustern durch die NLR-Proteine, die es erlaubt, zwischen Pathogenen und Kommensalen zu unterscheiden (Kaparakis *et al.*, 2007). Interessanterweise zeigen die NOD-like-Rezeptoren von Säugetieren Gemeinsamkeiten mit einer großen Familie von pflanzlichen Pathogen-Resistenz (R-)Genen (Chisholm *et al.*, 2006; Nurnberger *et al.*, 2004). Diese „pflanzlichen“ NLRs enthalten ebenfalls eine zentrale NOD- und eine C-terminale LRR-Domäne. Die Stimulation der kodierten R-Proteine induziert eine hypersensitive Reaktion (HR, *hypersensitive response*) (Ausubel *et al.*, 1995; Hulbert *et al.*, 2001). Die HR repräsentiert einen protektiven Mechanismus von Pflanzen gegenüber der Invasion von Pathogenen. Der Detektion des Pathogens folgt eine komplexe Signaltransduktionskaskade, die Kinasen aktiviert, Ionen-Flüsse modifiziert und die Produktion von ROS einschließt. Dieser Vorgang ist mit dem lokalen Zelltod verbunden, der so die Verbreitung des Pathogens begrenzt. Die ROS-Produktion wird von einem pflanzlichen Äquivalent des NADPH-Oxidase-Komplexes induziert und ähnelt dem *oxidativen burst* der Neutrophilen (Torres *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 1998).

Betrachtet man die evolutionäre Konservierung der NLRs wie auch der NOX-Enzyme, so stellt die NOD2-vermittelte ROS-Bildung möglicherweise einen sehr alten Abwehrmechanismus dar, der vergleichbar mit der hypersensitiven Reaktion von zytoplasmatischen R-Proteinen in Pflanzen ist.

#### 4.5 Die Rolle der Redox-Homöostase für entzündliche Erkrankungen

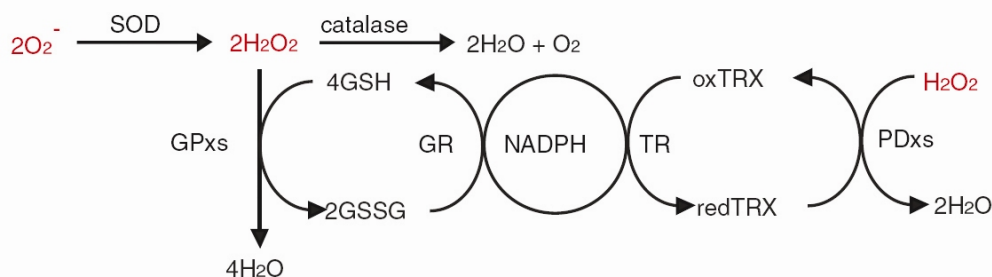
Sowohl erniedrigte als auch erhöhte ROS-Konzentrationen können pathologische Veränderungen bewirken. Bereits 1968 erkannten Baehner und Karnovsky, dass eine reduzierte Aktivität der Phagozyten NADPH-Oxidase in Patienten mit chronischer Granulomatose zu einer verminderten bakteriziden Aktivität führt (Baehner und Karnovsky, 1968). Frühzeitig wurde ebenfalls die Bedeutung eines Überschusses freier Radikale, des „oxidativen Stresses“, beschrieben. Mitte der 50 Jahre stellte Harman eine Theorie des Alterns auf Basis freier Radikale vor (Harman, 1956). Heute wird die Entstehung und Progression verschiedener degenerativer und chronischer Erkrankungen wie Arteriosklerose, Asthma, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus, chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, Krebs oder Morbus Alzheimer mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Valko *et al.*, 2007). Er ist verantwortlich für unspezifische Zellschäden wie DNA-Strangbrüche, Proteinoxidation oder Lipidperoxidation, die zu Funktionseinbußen führen und die Pathogenese beschleunigen können (Halliwell, 2007).

Im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist dabei bis heute ungeklärt, inwiefern oxidativer Stress die primäre Ursache oder sekundäre Begleiterscheinung der Erkrankung ist (Rosenstiel und Schreiber, 2008). Fest steht, dass durch die Entzündungsantwort hohe Mengen  $O_2^{\bullet-}$  von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Deren „oxidativer *burst*“ wirkt bakterizid, schädigt jedoch gleichzeitig das umgebende Gewebe (McCord und Wong, 1978). Darüber hinaus eine erhöhte Neutrophilen-Myeloperoxidase-Aktivität bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen (Kruidenier *et al.*, 2003). Trotzdem können hohe Konzentrationen an ROS auch antitumorigen wirken, indem sie beispielsweise spezifisch Zellsignalwege beeinflussen und etwa Apoptose induzieren (Simon *et al.*, 2000).

Wie die Ergebnisse zeigen, sind NOX-Enzyme in Kolonbiopsien von CED-Patienten und in Darmgewebe von Mäusen mit DSS-induzierter Colitis hochreguliert. Möglicherweise stellt dies ein Versuch der Epithelzellen dar, der Invasion von Pathogenen entgegenzusteuern und die Barriere wiederherzustellen. Nicht auszuschließen ist, dass die Biopsieproben infiltrierte Immunzellen enthalten, die das Ergebnis verfälschen. Dagegen spricht, dass pro-inflammatorische Bedingungen sowie die Infektion mit Listerien ebenfalls die Expression von NOX-Enzymen in HEK-293 und Caco-2 Zellen erhöhen.

#### 4.5.1 Zusammenhang zwischen der NOD2-Signalgebung und der Redox-Homöostase

Das antioxidative Netzwerk ist entscheidend an der Redox-Homöostase beteiligt. Zu ihm gehören die antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase, Katalase und weitere niedermolekulare Verbindungen wie Glutathion, Thioredoxin, Peroxiredoxin, Ascorbat, Tocopherol,  $\beta$ -Carotin. Redoxsysteme wie das Glutathion- oder Thioredoxinsystem erhalten im Zytoplasma reduzierende Bedingungen aufrecht (siehe Abbildung 4-3). Das Glutathion ist die bestimmende Größe des zellulären Redoxstatus (Rahman, 1999). Er wird durch das Verhältnis 2 GSH/GSSG definiert.



**Abbildung 4-3: Redox-Zyklus.**

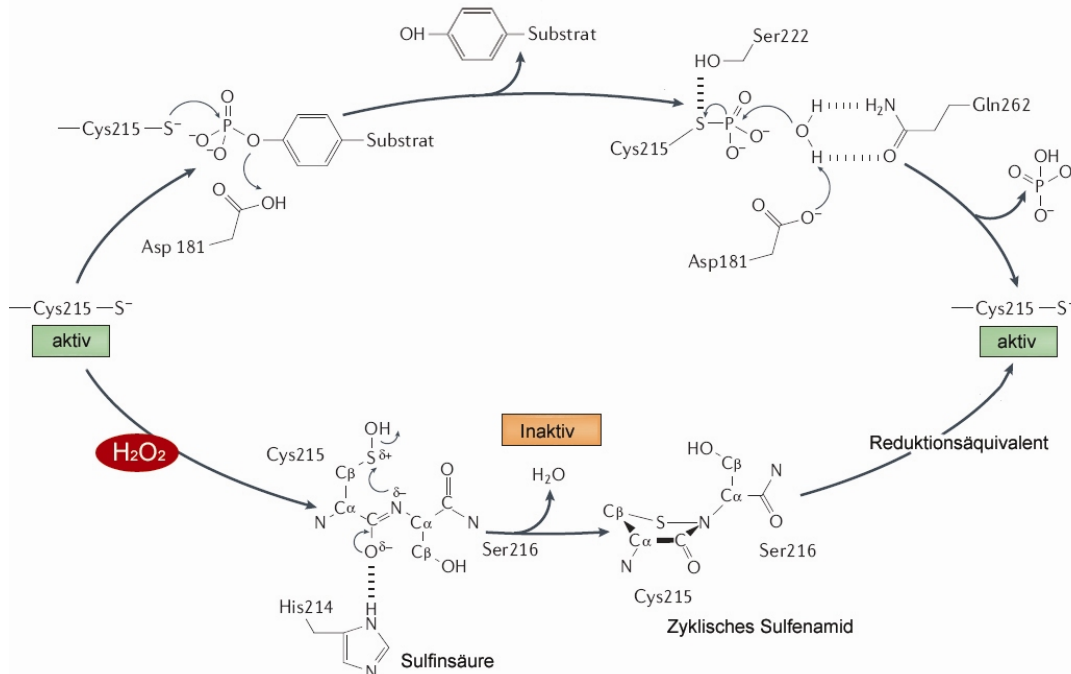
Das Superoxidradikal wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert. Dies kann entweder durch die Katalase, Glutathionperoxidase (GPx) oder Peroxiredoxine (PDXs) eliminiert werden. In der GPx katalysierten Reaktion wird dabei reduziert GSH oxidiert und wiederum von der Glutathionreduktase (GR) reduziert. Diese Reaktion verläuft NADPH-abhängig.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann auch mittels Thioredoxin durch Peroxiredoxine zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert werden. Das oxidierte Thioredoxin wird von der NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktase (TR) reduziert. Modifiziert nach (Nakano *et al.*, 2006).

Eine Verbindung zwischen der NOD2-Signalgebung und der Redox-Homöostase ist Peroxiredoxin IV (PDX4). Kürzlich wurde gezeigt, dass NOD2 die Expression von PDX4 hochreguliert (Weichert *et al.*, 2006). Das redox-sensitive Molekül beeinflusst unter anderem den NF- $\kappa$ B-Signalweg, indem es die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung moduliert (Jin *et al.*, 1997). Ein PDX4-*knockdown* erhöht die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Weichert *et al.*, 2006).

#### 4.5.2 Zusammenhang zwischen CED-Suszeptibilitätsfaktoren und der Redox-Homöostase

Da ROS strukturell zu einfach aufgebaut sind, um spezifisch erkannt zu werden, blieb lange Zeit ungeklärt, wie die erforderliche Spezifität der Signaltransduktion erreicht wird. Zwar oxidiert  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Cysteinreste von Proteinen, allerdings liegt der  $\text{pK}_s$ -Wert der Sulfhydrylgruppe bei den meisten Cysteinresten bei 8,5. Schließlich wurde gezeigt, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) über einen konservierten Cysteinrest (HC(X)<sub>5</sub>R) im katalytischen Zentrum verfügen, der einen geringen  $\text{pK}_s$ -Wert aufweist und unter physiologischen Bedingungen als Thiolat vorliegt. PTPs katalysieren die Hydrolyse von Phosphotyrosin und können durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  reversibel inaktiviert werden (Denu und Tanner,

1998; Kim *et al.*, 2000). PTPs kontrollieren eine Reihe von Signalprozessen, die einem breiten Spektrum physiologischer Prozesse unterliegen. Die reversible Oxidation von PTPs konnte bei mehreren Stimuli nachgewiesen werden, unter anderem EGF, Insulin, PDGF, UV-Licht, TNF- $\alpha$  und Rac (Nimnual *et al.*, 2003; Tonks, 2006).



**Abbildung 4-4: Reversible Oxidation von PTPB1 der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.**

Das konservierte Motiv im aktiven Zentrum der Proteine HC(X)<sub>5</sub>R enthält das essentielle Cystein-Thiolatanion (Cys215), das die Basis der Katalyse bildet. In einem ersten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff auf die Phosphatgruppe des Substrates. Dabei wird der Tyrosylrest mit Hilfe des PTP1B Aspartatrestes (ASP181) protoniert. Das Substrat wird freigesetzt und in einem zweiten Schritt Glutamin-abhängig (Gln262) das Cystein-Thiolatanion (Cys215) regeneriert und Phosphat freigesetzt. Die Oxidation dieses Cysteins durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibiert seine nukleophile Funktion und inaktiviert somit das Enzym. Die intermediär entstehende Sulfinsäure wird durch den benachbarten Aminosäurerest His214 polarisiert und kann vom ebenfalls benachbarten Ser216 nukleophil angegriffen werden. Dies führt zu einer kovalenten Bindung und einem Ringschluss zwischen dem Schwefel- und Stickstoffatom. Das entstandene zyklische Sulfenamid kann mittels eines Reduktionsäquivalentes wieder in das Cystein-Thiolatanion umgewandelt werden. Modifiziert nach (Tonks, 2006).

Interessanterweise wurden kürzlich genetische Faktoren identifiziert, die eine Verbindung zwischen der Redox-Signalgebung und CED-Pathogenese aufzeigen. Die p40<sup>phox</sup> Untereinheit von NOX2, NCF-4 (*neutrophil cytosolic factor 4*), ist mit Morbus Crohn assoziiert (Rioux *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde die Phosphotyrosin-Phosphatase (PTP) *PTPN2* zunächst als Suszeptibilitätsfaktor für Morbus Crohn identifiziert (Parkes *et al.*, 2007). In einer vor kurzem publizierten Studie wurde außerdem eine Assoziation von *PTPN2* mit Colitis ulcerosa beschrieben (Franke *et al.*, 2008). *PTPN2* ist an der Insulin-vermittelten Redox-Signalgebung beteiligt (Meng *et al.*, 2004). Von Bedeutung ist ebenfalls die *PTPN2*-induzierte Expression von IPAF, einem Mitglied der NLR-Familie und seine Beteiligung an der Caspase-1-induzierten Apoptose (Thalappilly *et al.*, 2006).



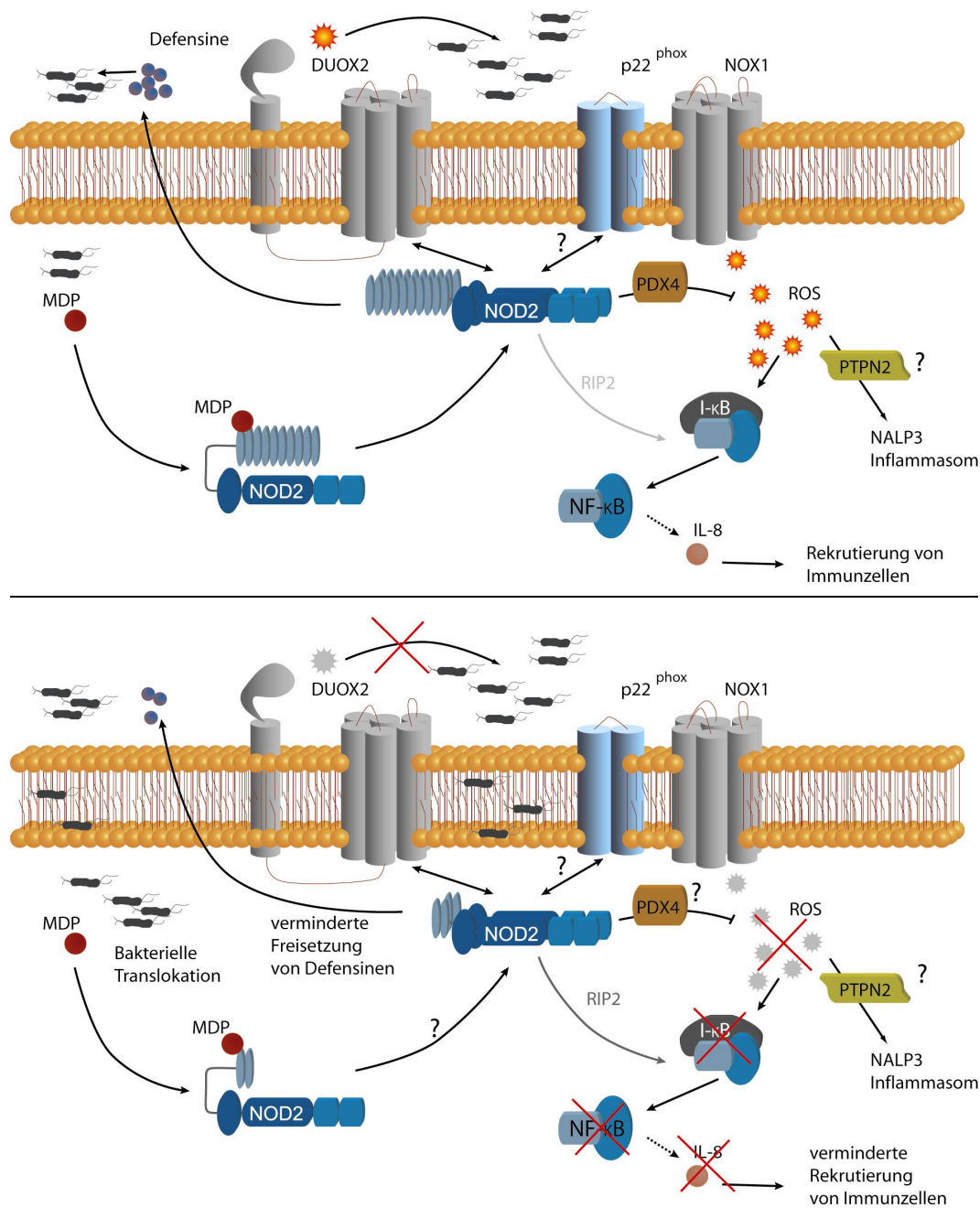
#### 4.5.3 Die Bedeutung der NOD2-vermittelten Redox-Homöostase für die Integrität der intestinale Barriere

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die NOD2-Variante SNP13 (L1007fsinsC) zu einer verminderten ROS-Produktion. Integriert man dieses Ergebnis in das bestehende Modell zur Pathogenese von CED durch NOD2-SNP13, so ist die fehlende ROS-Produktion ein weiterer Faktor, der den Verlust der epithelialen Barrierefunktion begünstigt. Ausgehend von dieser Hypothese würde neben der verminderten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und reduzierten Zytokin- und Defensin-Sekretion weniger antimikrobielle ROS entstehen. Die protektive Wirkung der Defensine und ROS entfällt, die epitheliale Barriere verliert ihre Integrität und ermöglicht die Invasion von Pathogenen. Die Translokation von Bakterien in das Zytosol führt zu einer Überaktivierung des intestinalen Immunsystems.

Bis heute ist die molekulare Wechselwirkung zwischen der NOD2-vermittelten Signalgebung und der Inflammasom-abhängigen Caspase-Aktivierung unklar. Jedoch gibt es zunehmend Hinweise, dass die Aktivierung und Assemblierung des Inflammasoms durch den zellulären Redox-Status beeinflusst wird. Insofern ist PTPN22 möglicherweise ein ROS-Sensor, der den Redox-Status und die Immunsignalgebung verbindet. In diesem Modell würden die intrazellulär erhöhten ROS-Level (*via* NOD2) das Netto-Resultat der NOD2-Signalgebung beeinflussen (NF- $\kappa$ B-Aktivierung), andererseits würden sie als direkter antimikrobieller Faktor und Verstärker der Inflammasom-Bildung dienen.

Mutationen in NOX-Genen und assoziierten Untereinheiten, die zu einer verminderten ROS-Produktion führen, sind mit der chronisch-granulomatösen Erkrankung (CGD, *chronic granulomatous disease*) verbunden. Häufig treten bei CGD-Patienten entzündliche Darmerkrankungen auf, die sich histologisch nicht von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa unterscheiden (Isaacs *et al.*, 1985; Werlin *et al.*, 1982). Betrachtet man die verminderte ROS-Produktion durch NOD2-SNP13 und die Assoziation mit Morbus Crohn, so führt der genetische NOX-Defekt zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, da möglicherweise die gleichen Signalwege fehlreguliert sind. Ein gemeinsames Kennzeichen der Erkrankungen ist die Bildung von Granulomen. Sie entstehen durch eine unzureichende Degradation von Fremdkörpern und pathogenem Material, welcher primär eine fehlregulierte Entzündungsantwort vorausgeht (Marks und Segal, 2008). Neben Morbus Crohn und NOD2-SNP13 sind weitere NLR-Mutationen mit entzündlich-granulomatösen Erkrankungen verbunden (Rosenstiel *et al.*, 2008).

Zusammengefasst ist die NOD2-vermittelte ROS-Produktion und die damit verbundene Redox-Homöostase ein entscheidender Faktor für die Integrität der intestinalen Barriere.



**Abbildung 4-5: Bedeutung von NOD2 und der Redox-Homöostase für die Integrität der intestinalen Barriere.**

Beitrag einer verminderten ROS-Produktion durch NOD2-SNP13 zur Pathogenese von Morbus Crohn. Neben der verminderten NF-κB-Aktivierung und reduzierten Zytokin- und Defensin-Sekretion würden weniger antimikrobielle ROS entstehen. Die protektive Wirkung der Defensine und ROS entfällt, die epitheliale Barriere verliert ihre Integrität und ermöglicht die Invasion von Pathogenen. Die Translokation von Bakterien in das Zytosol führt zu einer Überaktivierung des intestinalen Immunsystems. Modifiziert nach (Schreiber *et al.*, 2005).

## 4.6 Ausblick

NOD2 aktiviert mehrere Ebenen der Immunabwehr, darunter die ROS-Produktion, den NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie die Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden. Das Gleichgewicht dieser Faktoren bewahrt die Integrität der intestinalen epithelialen Barriere.

Die Fehlregulierung von NOD2 resultiert in einer verminderten ROS-Produktion. Sie wird durch verschiedene Faktoren begünstigt und zerstört die Redox-Homöostase. Durch generelle Entzündungsreaktionen führt dies paradoxerweise zu oxidativem Stress und den damit verbundenen Zell- und Gewebeschäden.

Eine erweiterte Definition von „oxidativem Stress“, die nicht mehr das bloße Verhältnis von Pro- und Antioxidantien (wie z.B. der GSH/GSSG Ratio) betrachtet, löst dieses scheinbare Paradoxon auf. Danach resultiert oxidativer Stress vielmehr aus einer Störung der Redox-Signalgebung und ihrer Kontrolle. Die Identifizierung von Schlüsselstellen der Störungen bietet ein Ziel für therapeutische Interventionen (Jones, 2006). Hieraus und aus den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit leiten sich Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen ab:

- Welches sind die Schlüsselstellen der NOD2-vermittelten Redox-Signalgebung und inwiefern bieten diese Ansatzpunkte für gezielte therapeutische Interventionen?
  - Welche Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPN2?
  - Wie findet der *cross-talk* zum Inflammasom statt? Wird er durch die Redox-Signalgebung reguliert?
- Welche weiteren Faktoren beeinflussen die Aktivität der NADPH-Oxidasen NOX1 und DUOX2 in intestinalen Epithelzellen?
  - Welche Rolle spielt die NOD2-vermittelte Redox-Signalgebung in Bezug auf die TLR5-abhängige NOX-Aktivierung?
  - Inwiefern hat die NOD2-vermittelte ROS-Produktion eine Bedeutung für die Autophagie? Sind NOX-Enzyme in Autophagosomen lokalisiert oder werden sie im Rahmen des Prozesses in diese inkorporiert?

## 5 Zusammenfassung

Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als direkte intrazelluläre Botenstoffe agieren und entscheidend an Abwehrprozessen gegen Pathogene beteiligt sind. Viele Eukaryoten nutzen die mikrobizide Wirkung als protektive Komponente des angeborenen Immunsystems.

NOD (*nucleotide oligomerisation domain containing protein*)-like-Rezeptoren (NLRs) sind phylogenetisch konservierte Sensoren, die intrazelluläre Pathogene oder endogene Gefahren-Signale erkennen. NOD2 detektiert die bakterielle Zellwandkomponente Muramyl-dipeptid (MDP) und aktiviert über die Serin-Threonin-Kinase RIP2 die NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalkaskaden. Neben der damit verbundenen Freisetzung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden besitzt NOD2 direkte antibakterielle Eigenschaften. Mutationen des NOD2-Gens sind mit einem erhöhten Risiko für chronisch-entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn, Sarkoidose und Blau-Syndrom verbunden. Die mit Morbus Crohn assoziierte NOD2-Variante L1007fsinsC (SNP13) führt zu einer verminderten Abwehr der intestinalen Epithelzellen und begünstigt die durch bakterielle Pathogene initiierte Entzündungsreaktion.

Diese Arbeit zeigt, dass ROS als Mediatoren der NOD2-Signalgebung agieren. Die Mitglieder der NADPH-Oxidasen-Familie DUOX2 und NOX1 wurden als subzelluläre ROS-Quellen in intestinalen Epithelzellen identifiziert. NOX1 und DUOX2 sind zusammen mit NOD2 an der Zellmembran lokalisiert, darüber hinaus ist DUOX2 an den bakteriziden Effekten von NOD2 beteiligt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Verständnis der NOD2-vermittelten Immunantwort in intestinalen Epithelzellen: NOD2 aktiviert mehrere Ebenen der Immunabwehr, die neben dem NF- $\kappa$ B-Signalweg, der Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden auch die kontrollierte Produktion von ROS einschließen. Betrachtet man die evolutionäre Konservierung der NLRs, so stellt die NOD2-vermittelte ROS-Bildung möglicherweise einen phylogenetisch alten Abwehrmechanismus dar, der vergleichbar mit der hypersensitiven Reaktion von zytoplasmatischen R-Proteinen in Pflanzen ist.

Ein fehlreguliertes Redox-Gleichgewicht stellt eine Ursache der pathologischen NOD2-Dysfunktion dar. Die Beobachtung, dass in der Folge DUOX2 bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hochreguliert ist, deutet möglicherweise auf einen - letztendlich nutzlosen - Versuch der Epithelzellen hin, die Funktion der gestörten Barriere wiederherzustellen. Gleichzeitig zeigt sich die ambivalente Natur der ROS. Obwohl die kontrollierte ROS-Bildung einen Schutz gegenüber Pathogenen darstellt, führt die exzessive ROS-Produktion zur Gewebeerstörung und letztendlich zu entzündlichen Erkrankungen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine bisher unbekannte Rolle der NOD2-abhängigen Signaltransduktion hin, die Veränderungen des zellulären Redox-Status als Verstärker- und Effektor-Mechanismen der angeborenen Abwehr benutzt.

## 6 Abstract

Over the past years it has become apparent that reactive oxygen species (ROS) are crucially involved in host defense and cell signaling. Generation of microbicidal ROS is a pivotal protective component of the innate immune system in many eukaryotes.

NOD (nucleotide oligomerisation domain containing protein)-like receptors (NLRs) have been implicated as phylogenetically ancient sensors of intracellular pathogens or endogenous danger signals. NOD2 recognizes the bacterial cell wall component muramyl dipeptide (MDP) leading to NF- $\kappa$ B and MAPK activation via induced proximity signalling through the serine-threonine kinase RIP2. In addition to the subsequent induction of cytokines and antimicrobial peptides, NOD2 has been shown to also exert a direct antibacterial effect. Mutations in the NOD2 gene give rise to various inflammatory diseases like Crohn disease, early-onset sarcoidosis and Blau syndrome. Crohn disease-associated NOD2 variants lead to loss-of-barrier function of the intestinal epithelium and promote inflammatory conditions triggered by bacterial pathogens.

In this dissertation, controlled ROS generation is demonstrated for the first time as an integral component of NOD2-induced signalling. The NADPH oxidase family members DUOX2 and NOX1 are both involved in a ROS-dependent NF- $\kappa$ B amplification loop downstream of NOD2 in intestinal epithelial cells. NOX1 and DUOX2 co-localize with NOD2 at the plasma membrane. Moreover, the presence of DUOX2 is required for the direct bactericidal properties of NOD2.

It is hypothesized that the mechanism suggested here opens new avenues for the understanding of immune responses initiated by the colonic epithelium: NOD2 activates multiple layers of host defense, including ROS generation, NF- $\kappa$ B activation and cytokine/antimicrobial peptide secretion. Given the deep evolutionary conservation of NLRs, it is tempting to speculate that NLR-dependent ROS formation and sensing may represent an ancient defense mechanism, which is similar to the hypersensitive reaction induced by cytoplasmic *R*-genes in plants.

Additionally it is assumed that NOD2 dysfunction is at least in part caused by disturbing counter-regulatory antioxidant responses. In conclusion, the observation that DUOX2 is upregulated in human inflammatory bowel disease may point to a futile attempt to restore barrier function but it also unveils the two-sided face of ROS: although controlled ROS generation is a protective response against pathogens, excessive ROS formation leads to tissue destruction, ultimately resulting in inflammatory disorders. Taken together, the results point to a formerly unrecognized role of NOD2-dependent ROS formation for using the delicate equilibrium of the cellular redox status as amplification and effector mechanism of innate defense programs.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham, S.N., M.J. Duncan, G. Li, and D. Zaas. 2005. Bacterial penetration of the mucosal barrier by targeting lipid rafts. *J Investig Med*. 53:318-21.
- Agerberth, B., and G.H. Gudmundsson. 2006. Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 306:67-90.
- Albrecht, M., F.S. Domingues, S. Schreiber, and T. Lengauer. 2003. Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Lett*. 554:520-8.
- Ambasta, R.K., P. Kumar, K.K. Griendling, H.H. Schmidt, R. Busse, and R.P. Brandes. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 279:45935-41.
- Ameziane-El-Hassani, R., S. Morand, J.L. Boucher, Y.M. Frapart, D. Apostolou, D. Agnandji, S. Gnidehou, R. Ohayon, M.S. Noel-Hudson, J. Francon, K. Lalaoui, A. Virion, and C. Dupuy. 2005. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *J Biol Chem*. 280:30046-54.
- Amieva, M.R., N.R. Salama, L.S. Tompkins, and S. Falkow. 2002. Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 4:677-90.
- Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 8:411-20.
- Asehnoune, K., D. Strassheim, S. Mitra, J.Y. Kim, and E. Abraham. 2004. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol*. 172:2522-9.
- Ausubel, F.M., F. Katagiri, M. Mindrinos, and J. Glazebrook. 1995. Use of Arabidopsis thaliana defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:4189-96.
- Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte. 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 52:741-4.
- Bach, J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 347:911-20.
- Backhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, and J.I. Gordon. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307:1915-20.

- Baehner, R.L., and M.L. Karnovsky. 1968. Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*. 162:1277-9.
- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demarex, and K.H. Krause. 2001. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*. 276:37594-601.
- Barnich, N., J.E. Aguirre, H.C. Reinecker, R. Xavier, and D.K. Podolsky. 2005a. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol*. 170:21-6.
- Barnich, N., T. Hisamatsu, J.E. Aguirre, R. Xavier, H.C. Reinecker, and D.K. Podolsky. 2005b. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 280:19021-6.
- Bedard, K., and K.H. Krause. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 87:245-313.
- Bedard, K., B. Lardy, and K.H. Krause. 2007. NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie*.
- Bjorkman, U., and R. Ekholm. 1984. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology*. 115:392-8.
- Boatright, K.M., and G.S. Salvesen. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 15:725-31.
- Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 25:280-8.
- Bubici, C., S. Papa, K. Dean, and G. Franzoso. 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor- $\kappa$ B: molecular basis and biological significance. *Oncogene*. 25:6731-48.
- Caselli, A., M.L. Taddei, C. Bini, P. Paoli, G. Camici, G. Manao, P. Cirri, and G. Ramponi. 2007. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase and caveolin-1: interaction and isoenzyme-dependent regulation. *Biochemistry*. 46:6383-92.
- Chen, C.M., Y. Gong, M. Zhang, and J.J. Chen. 2004. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J Biol Chem*. 279:25876-82.
- Cheng, G., D. Ritsick, and J.D. Lambeth. 2004. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem*. 279:34250-5.
- Chisholm, S.T., G. Coaker, B. Day, and B.J. Staskawicz. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124:803-14.
- Choi, M.H., I.K. Lee, G.W. Kim, B.U. Kim, Y.H. Han, D.Y. Yu, H.S. Park, K.Y. Kim, J.S. Lee, C. Choi, Y.S. Bae, B.I. Lee, S.G. Rhee, and S.W. Kang. 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. 435:347-53.

- Colas, C., and P.R. Ortiz de Montellano. 2003. Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification. *Chem Rev.* 103:2305-32.
- Cossart, P., and P.J. Sansonetti. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* 304:242-8.
- Cross, A.R., J. Rae, and J.T. Curnutte. 1995. Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem.* 270:17075-7.
- Daiyasu, H., and H. Toh. 2000. Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *J Mol Evol.* 51:433-45.
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol.* 66:361-84.
- De Deken, X., D. Wang, M.C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J.E. Dumont, and F. Miot. 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 275:23227-33.
- De Leo, F.R., K.V. Ulman, A.R. Davis, K.L. Jutila, and M.T. Quinn. 1996. Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem.* 271:17013-20.
- Denu, J.M., and K.G. Tanner. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 37:5633-42.
- Dikalov, S.I., A.E. Dikalova, A.T. Bikineyeva, H.H. Schmidt, D.G. Harrison, and K.K. Griendling. 2008. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.*
- Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B.T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 320:674-7.
- Duncan, M.J., G. Li, J.S. Shin, J.L. Carson, and S.N. Abraham. 2004. Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *J Biol Chem.* 279:18944-51.
- Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, M.S. Noel-Hudson, D. Deme, and A. Virion. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem.* 274:37265-9.
- Edens, W.A., L. Sharling, G. Cheng, R. Shapira, J.M. Kinkade, T. Lee, H.A. Edens, X. Tang, C. Sullards, D.B. Flaherty, G.M. Benian, and J.D. Lambeth. 2001. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol.* 154:879-91.



- Eitel, J., M. Krull, A.C. Hocke, P.D. N'Guessan, J. Zahlten, B. Schmeck, H. Slevogt, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and B. Opitz. 2008. Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol.* 181:2664-71.
- El Hassani, R.A., N. Benfares, B. Caillou, M. Talbot, J.C. Sabourin, V. Belotte, S. Morand, S. Gnidehou, D. Agnandji, R. Ohayon, J. Kaniewski, M.S. Noel-Hudson, J.M. Bidart, M. Schlumberger, A. Virion, and C. Dupuy. 2005. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G933-42.
- Faustin, B., and J.C. Reed. 2008. Sunburned skin activates inflammasomes. *Trends Cell Biol.* 18:4-8.
- Finkel, T., and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239-47.
- Foerder, C.A., S.J. Klebanoff, and B.M. Shapiro. 1978. Hydrogen peroxide production, chemiluminescence, and the respiratory burst of fertilization: interrelated events in early sea urchin development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:3183-7.
- Forteza, R., M. Salathe, F. Miot, R. Forteza, and G.E. Conner. 2005. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32:462-9.
- Franke, A., T. Balschun, T.H. Karlsen, J. Hedderich, S. May, T. Lu, D. Schuldt, S. Nikolaus, P. Rosenstiel, M. Krawczak, and S. Schreiber. 2008. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet.* 40:713-5.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3:710-20.
- Geiszt, M., J.B. Kopp, P. Varnai, and T.L. Leto. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8010-4.
- Geiszt, M., K. Lekstrom, J. Witta, and T.L. Leto. 2003a. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem.* 278:20006-12.
- Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom, and T.L. Leto. 2003b. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *Faseb J.* 17:1502-4.
- Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109 Suppl:S81-96.
- Girardin, S.E., I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott. 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 300:1584-7.

- Girardin, S.E., I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott, and P.J. Sansonetti. 2003b. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 278:8869-72.
- Girardin, S.E., J.P. Hugot, and P.J. Sansonetti. 2003c. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol*. 24:652-8.
- Glauert, A.M., and M.J. Thornley. 1969. The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol*. 23:159-98.
- Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette. 2006. NF-[kappa]B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology Special Issue: Cell Signalling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets*. 72:1493-1505.
- Gordon, H.A., and L. Pesti. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev*. 35:390-429.
- Grasberger, H., and S. Refetoff. 2006. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem*. 281:18269-72.
- Guarner, F., and J.R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361:512-9.
- Gutierrez, O., C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez, and J.L. Fernandez-Luna. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*. 277:41701-5.
- Ha, E.M., C.T. Oh, Y.S. Bae, and W.J. Lee. 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*. 310:847-50.
- Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J*. 1:358-64.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 35:1147-50.
- Halliwell, B., and J.M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 219:1-14.
- Hampe, J., A. Cuthbert, P.J. Croucher, M.M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeier, A.J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J.E. Lennard-Jones, U.R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber, and C.G. Mathew. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 357:1925-8.
- Hanisch, F.G., and S. Muller. 2000. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 10:439-49.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11:298-300.

- Harmsen, H.J., A.C. Wildeboer-Veloo, G.C. Raangs, A.A. Wagendorp, N. Klijn, J.G. Bindels, and G.W. Welling. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30:61-7.
- Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho. 2002. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 15:79-94.
- Heyworth, P.G., A.R. Cross, and J.T. Curnutte. 2003. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 15:578-84.
- Hisamatsu, T., M. Suzuki, H.C. Reinecker, W.J. Nadeau, B.A. McCormick, and D.K. Podolsky. 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 124:993-1000.
- Hooper, L.V., and J.I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292:1115-8.
- Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411:599-603.
- Hulbert, S.H., C.A. Webb, S.M. Smith, and Q. Sun. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol.* 39:285-312.
- Igo, R.P., C.P. Mahoney, and B. Mackler. 1964. STUDIES OF THE BIOSYNTHESIS OF THYROXINE. I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A PARTICULATE IODIDE PEROXIDASE FROM THYROID TISSUE. *J Biol Chem.* 239:1893-7.
- Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74:355-83.
- Inohara, N., and G. Nunez. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 3:371-82.
- Inohara, N., Y. Ogura, F.F. Chen, A. Muto, and G. Nunez. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* 276:2551-4.
- Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S.J. Foster, A.P. Moran, J.L. Fernandez-Luna, and G. Nunez. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 278:5509-12.
- Isaacs, D., V.M. Wright, D.G. Shaw, F. Raafat, and J.A. Walker-Smith. 1985. Chronic granulomatous disease mimicking Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 4:498-501.

- Jacobsen, B.A., J. Fallingborg, H.H. Rasmussen, K.R. Nielsen, A.M. Drewes, E. Puho, G.L. Nielsen, and H.T. Sorensen. 2006. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 18:601-6.
- Jay, D.B., C.A. Papaharalambus, B. Seidel-Rogol, A.E. Dikalova, B. Lassegue, and K.K. Griending. 2008. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 45:329-35.
- Jewell, D.P. 1998. Ulcerative colitis and Crohn's disease--susceptibility genes and clinical patterns. *J Gastroenterol*. 33:458-62.
- Jin, D.Y., H.Z. Chae, S.G. Rhee, and K.T. Jeang. 1997. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 272:30952-61.
- Johnson, K.R., C.C. Marden, P. Ward-Bailey, L.H. Gagnon, R.T. Bronson, and L.R. Donahue. 2007. Congenital hypothyroidism, dwarfism, and hearing impairment caused by a missense mutation in the mouse dual oxidase 2 gene, Duox2. *Mol Endocrinol*. 21:1593-602.
- Jones, D.P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 8:1865-79.
- Kaiser, V., and G. Diamond. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol*. 68:779-84.
- Kaparakis, M., D.J. Philpott, and R.L. Ferrero. 2007. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol Cell Biol*. 85:495-502.
- Kawahara, T., Y. Kuwano, S. Teshima-Kondo, R. Takeya, H. Sumimoto, K. Kishi, S. Tsunawaki, T. Hirayama, and K. Rokutan. 2004a. Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 172:3051-8.
- Kawahara, T., Y. Kuwano, S. Teshima-Kondo, R. Takeya, H. Sumimoto, K. Kishi, S. Tsunawaki, T. Hirayama, and K. Rokutan. 2004b. Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 1 in Oxidative Burst Response to Toll-Like Receptor 5 Signaling in Large Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol*. 172:3051-3058.
- Kawahara, T., M.T. Quinn, and J.D. Lambeth. 2007. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol*. 7:109.
- Kawahara, T., S. Teshima, A. Oka, T. Sugiyama, K. Kishi, and K. Rokutan. 2001. Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun*. 69:4382-9.
- Kim, J.R., H.W. Yoon, K.S. Kwon, S.R. Lee, and S.G. Rhee. 2000. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem*. 283:214-21.

- Kim, S.H., V.J. Johnson, T.Y. Shin, and R.P. Sharma. 2004. Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*. 229:203-13.
- Kim, Y.S., M.J. Morgan, S. Choksi, and Z.G. Liu. 2007. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell*. 26:675-87.
- Kobayashi, K., N. Inohara, L.D. Hernandez, J.E. Galan, G. Nunez, C.A. Janeway, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*. 416:194-9.
- Kraehenbuhl, J.P., and M.R. Neutra. 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16:301-32.
- Kruidenier, L., I. Kuiper, C.B. Lamers, and H.W. Verspaget. 2003. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*. 201:28-36.
- Kufer, T.A., E. Kremmer, D.J. Banks, and D.J. Philpott. 2006. Role for erbin in bacterial activation of Nod2. *Infect Immun*. 74:3115-24.
- Kundu, J.K., Y.K. Shin, and Y.J. Surh. 2006. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. *Biochem Pharmacol*. 72:1506-15.
- Kundu, J.K., and Y.J. Surh. 2007. Epigallocatechin gallate inhibits phorbol ester-induced activation of NF-kappa B and CREB in mouse skin: role of p38 MAPK. *Ann N Y Acad Sci*. 1095:504-12.
- Lafont, F., and F.G. van der Goot. 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol*. 7:613-20.
- Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S.Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez, and S. Keshav. 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 125:47-57.
- Lalucque, H., and P. Silar. 2003. NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol*. 11:9-12.
- Lambeth, J.D., G. Cheng, R.S. Arnold, and W.A. Edens. 2000. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*. 25:459-61.
- Lauritano, E.C., A.L. Bilotta, M. Gabrielli, E. Scarpellini, A. Lupascu, A. Laginestra, M. Novi, S. Sottili, M. Serricchio, G. Cammarota, G. Gasbarrini, A. Pontecorvi, and A. Gasbarrini. 2007. Association between hypothyroidism and small intestinal bacterial overgrowth. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:4180-4.

- Lee, J.G., S.H. Lee, D.W. Park, H.S. Yoon, B.R. Chin, J.H. Kim, J.R. Kim, and S.H. Baek. 2008a. Toll-like receptor 9-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 is mediated via JNK-cytosolic phospholipase A2-ROS signaling. *Cell Signal*. 20:105-11.
- Lee, J.G., E.J. Lim, D.W. Park, S.H. Lee, J.R. Kim, and S.H. Baek. 2008b. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. *Cell Signal*.
- Lee, J.K., M. Edderkaoui, P. Truong, I. Ohno, K.T. Jang, A. Berti, S.J. Pandol, and A.S. Gukovskaya. 2007. NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology*. 133:1637-48.
- Lee, P.L., C. West, K. Crain, and L. Wang. 2006. Genetic polymorphisms and susceptibility to lung disease. *J Negat Results Biomed*. 5:5.
- Legrand-Poels, S., G. Kustermans, F. Bex, E. Kremmer, T.A. Kufer, and J. Piette. 2007. Modulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 120:1299-310.
- Li, P.L., and E. Gulbins. 2007. Lipid rafts and redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 9:1411-5.
- Loftus, E.V., Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 126:1504-17.
- Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y.G. Kim, D. Miller, C. McDonald, G.J. Boons, and G. Nunez. 2008. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol*. 180:4050-7.
- Marks, D.J., and A.W. Segal. 2008. Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *J Pathol*. 214:260-6.
- Martindale, J.L., and N.J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 192:1-15.
- Martinon, F. 2007. Orchestration of pathogen recognition by inflammasome diversity: Variations on a common theme. *Eur J Immunol*. 37:3003-6.
- Martinon, F., O. Gaide, V. Petrilli, A. Mayor, and J. Tschopp. 2007. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol*. 29:213-29.
- Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 440:237-41.
- Martinon, F., and J. Tschopp. 2006. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*. 14:10-22.
- Mayor, A., F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli, and J. Tschopp. 2007. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol*. 8:497-503.

- McCord, J.M., and K. Wong. 1978. Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. *Ciba Found Symp*:343-60.
- McDonald, C., F.F. Chen, V. Ollendorff, Y. Ogura, S. Marchetto, P. Lecine, J.P. Borg, and G. Nunez. 2005. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*. 280:40301-9.
- Meng, T.C., D.A. Buckley, S. Galic, T. Tiganis, and N.K. Tonks. 2004. Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J Biol Chem*. 279:37716-25.
- Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 442:39-44.
- Moreno, J.C., H. Bikker, M.J. Kempers, A.S. van Trotsenburg, F. Baas, J.J. de Vijlder, T. Vulsma, and C. Ris-Stalpers. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*. 347:95-102.
- Moskwa, P., D. Lorentzen, K.J. Excoffon, J. Zabner, P.B. McCray, Jr., W.M. Nauseef, C. Dupuy, and B. Banfi. 2007. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 175:174-83.
- Moynagh, P.N. 2005. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*. 26:469-76.
- Muruve, D.A., V. Petrilli, A.K. Zaiss, L.R. White, S.A. Clark, P.J. Ross, R.J. Parks, and J. Tschopp. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 452:103-7.
- Nakano, H., A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, J.H. Piao, X. Xue, and K. Okumura. 2006. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ*. 13:730-7.
- Nauseef, W.M. 2008. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem*. 283:16961-5.
- Nielsen, O.H., T. Koppen, N. Rudiger, T. Horn, J. Eriksen, and I. Kirman. 1996. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 41:1786-93.
- Niessen, C.M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 127:2525-32.
- Nikolaus, S., J. Bauditz, P. Gionchetti, C. Witt, H. Lochs, and S. Schreiber. 1998. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut*. 42:470-6.
- Nimnual, A.S., L.J. Taylor, and D. Bar-Sagi. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*. 5:236-41.
- Nurnberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*. 198:249-66.

- Ogura, Y., D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez, and J.H. Cho. 2001a. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411:603-6.
- Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F.F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez. 2001b. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 276:4812-8.
- Orrhage, K., and C.E. Nord. 2000. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. *Drugs Exp Clin Res*. 26:95-111.
- Palmer, C., E.M. Bik, D.B. Digiulio, D.A. Relman, and P.O. Brown. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol*. 5:e177.
- Park, H.S., H.Y. Jung, E.Y. Park, J. Kim, W.J. Lee, and Y.S. Bae. 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol*. 173:3589-93.
- Parkes, M., J.C. Barrett, N.J. Prescott, M. Tremelling, C.A. Anderson, S.A. Fisher, R.G. Roberts, E.R. Nimmo, F.R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C.W. Lees, S.A. Khawaja, R. Bagnall, D.A. Burke, C.E. Todhunter, T. Ahmad, C.M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C.M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D.P. Jewell, J. Satsangi, J.C. Mansfield, L. Cardon, and C.G. Mathew. 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 39:830-2.
- Parronchi, P., P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli, and S. Romagnani. 1997. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 150:823-32.
- Perez-Vilar, J., and R. Mabolo. 2007. Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histol Histopathol*. 22:455-64.
- Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp. 2007. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 14:1583-9.
- Podolsky, D.K. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 347:417-29.
- Rahman, I. 1999. Inflammation and the regulation of glutathione level in lung epithelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 1:425-47.
- Rahman, I., S.K. Biswas, and P.A. Kirkham. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 72:1439-52.



- Remacle, J., M. Raes, O. Toussaint, P. Renard, and G. Rao. 1995. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res.* 316:103-22.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2:361-7.
- Rhee, S.G. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 31:53-9.
- Rhee, S.G., Y.S. Bae, S.R. Lee, and J. Kwon. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.* 2000:PE1.
- Rioux, J.D., R.J. Xavier, K.D. Taylor, M.S. Silverberg, P. Goyette, A. Huett, T. Green, P. Kuballa, M.M. Barmada, L.W. Datta, Y.Y. Shugart, A.M. Griffiths, S.R. Targan, A.F. Ippoliti, E.J. Bernard, L. Mei, D.L. Nicolae, M. Regueiro, L.P. Schumm, A.H. Steinhart, J.I. Rotter, R.H. Duerr, J.H. Cho, M.J. Daly, and S.R. Brant. 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 39:596-604.
- Roberts, R.L., J.E. Hollis-Moffatt, R.B. Gearry, M.A. Kennedy, M.L. Barclay, and T.R. Merriman. 2008. Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun.* 9:561-5.
- Rogler, G., K. Brand, D. Vogl, S. Page, R. Hofmeister, T. Andus, R. Knuechel, P.A. Baeuerle, J. Scholmerich, and V. Gross. 1998. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 115:357-69.
- Rokutan, K., T. Kawahara, Y. Kuwano, K. Tominaga, A. Sekiyama, and S. Teshima-Kondo. 2006. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 8:1573-82.
- Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Brautigam, T. Kuhbacher, G.H. Waetzig, D. Seegert, and S. Schreiber. 2003. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 124:1001-9.
- Rosenstiel, P., S. Hellmig, J. Hampe, S. Ott, A. Till, W. Fischbach, H. Sahly, R. Lucius, U.R. Folsch, D. Philpott, and S. Schreiber. 2006. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol.* 8:1188-98.
- Rosenstiel, P., G. Jacobs, A. Till, and S. Schreiber. 2008. NOD-like receptors: Ancient sentinels of the innate immune system. *Cell Mol Life Sci.*

- Rosenstiel, P., and S. Schreiber. 2008. Expression signatures, barriers and beyond: the role of oxidative stress in murine colitis and human inflammatory bowel disease revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 20:496-9.
- Ryan, K.A., M.F. Smith, Jr., M.K. Sanders, and P.B. Ernst. 2004. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun*. 72:2123-30.
- Ryu, J.H., E.M. Ha, C.T. Oh, J.H. Seol, P.T. Brey, I. Jin, D.G. Lee, J. Kim, D. Lee, and W.J. Lee. 2006. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO J*. 25:3693-701.
- Salzman, N.H., D. Ghosh, K.M. Huttner, Y. Paterson, and C.L. Bevins. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*. 422:522-6.
- Sartor, R.B. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 3:390-407.
- Schleifer, K.H., and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*. 36:407-77.
- Schoonbroodt, S., V. Ferreira, M. Best-Belpomme, J.R. Boelaert, S. Legrand-Poels, M. Korner, and J. Piette. 2000. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol*. 164:4292-300.
- Schreiber, S., S. Nikolaus, J. Hampe, J. Hamling, I. Koop, B. Groessner, H. Lochs, and A. Raedler. 1999. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet*. 353:459-61.
- Schreiber, S., P. Rosenstiel, M. Albrecht, J. Hampe, and M. Krawczak. 2005. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet*. 6:376-88.
- Segal, A.W., O.T. Jones, D. Webster, and A.C. Allison. 1978. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet*. 2:446-9.
- Seveau, S., H. Bierne, S. Giroux, M.C. Prevost, and P. Cossart. 2004. Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol*. 166:743-53.
- Seveau, S., T.N. Tham, B. Payrastre, A.D. Hoppe, J.A. Swanson, and P. Cossart. 2007. A FRET analysis to unravel the role of cholesterol in Rac1 and PI 3-kinase activation in the InIB/Met signalling pathway. *Cell Microbiol*. 9:790-803.
- Shao, D., A.W. Segal, and L.V. Dekker. 2003. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett*. 550:101-6.

- Shibuya, H., N. Ohkohchi, S. Tsukamoto, and S. Satomi. 1997. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology*. 26:113-20.
- Shin, D.M., C.S. Yang, J.Y. Lee, S.J. Lee, H.H. Choi, H.M. Lee, J.M. Yuk, C.V. Harding, and E.K. Jo. 2008. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C zeta in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages. *Cell Microbiol*. 10:1893-905.
- Silverman, D.H., H. Wu, and M.L. Karnovsky. 1985. Muramyl peptides and serotonin interact at specific binding sites on macrophages and enhance superoxide release. *Biochem Biophys Res Commun*. 131:1160-7.
- Simms, L.A., J.D. Doecke, M.D. Walsh, N. Huang, E.V. Fowler, and G.L. Radford-Smith. 2008. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 57:903-10.
- Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 5:415-8.
- Storz, P., and A. Toker. 2003. Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J*. 22:109-20.
- Strober, W., B. Kelsall, and T. Marth. 1998. Oral tolerance. *J Clin Immunol*. 18:1-30.
- Szanto, I., L. Rubbia-Brandt, P. Kiss, K. Steger, B. Banfi, E. Kovari, F. Herrmann, A. Hadengue, and K.H. Krause. 2005. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 207:164-76.
- Takada, Y., A. Mukhopadhyay, G.C. Kundu, G.H. Mahabeleshwar, S. Singh, and B.B. Aggarwal. 2003. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 278:24233-41.
- Takaoka, A., Z. Wang, M.K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba, and T. Taniguchi. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 448:501-5.
- Takeda, K., and S. Akira. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*. 34:73-82.
- Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 17:1-14.

- Tan, P.H., P. Sagoo, C. Chan, J.B. Yates, J. Campbell, S.C. Beutelspacher, B.M. Foxwell, G. Lombardi, and A.J. George. 2005. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol.* 174:7633-44.
- Tanabe, T., M. Chamaillard, Y. Ogura, L. Zhu, S. Qiu, J. Masumoto, P. Ghosh, A. Moran, M.M. Predergast, G. Tromp, C.J. Williams, N. Inohara, and G. Nunez. 2004. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 23:1587-97.
- Tattoli, I., L.A. Carneiro, M. Jehanno, J.G. Magalhaes, Y. Shu, D.J. Philpott, D. Arnoult, and S.E. Girardin. 2008. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep.* 9:293-300.
- Tattoli, I., L.H. Travassos, L.A. Carneiro, J.G. Magalhaes, and S.E. Girardin. 2007. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol.* 29:289-301.
- Thalappilly, S., S. Sadasivam, V. Radha, and G. Swarup. 2006. Involvement of caspase 1 and its activator Ipaf upstream of mitochondrial events in apoptosis. *FEBS J.* 273:2766-78.
- Thannickal, V.J., and B.L. Fanburg. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L1005-28.
- Till, A., P. Rosenstiel, K. Brautigam, C. Sina, G. Jacobs, H.H. Oberg, D. Seegert, T. Chakraborty, and S. Schreiber. 2008. A role for membrane-bound CD147 in NOD2-mediated recognition of bacterial cytoinvasion. *J Cell Sci.* 121:487-95.
- Ting, J.P., R.C. Lovering, E.S. Alnemri, J. Bertin, J.M. Boss, B.K. Davis, R.A. Flavell, S.E. Girardin, A. Godzik, J.A. Harton, H.M. Hoffman, J.P. Hugot, N. Inohara, A. Mackenzie, L.J. Maltais, G. Nunez, Y. Ogura, L.A. Otten, D. Philpott, J.C. Reed, W. Reith, S. Schreiber, V. Steimle, and P.A. Ward. 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 28:285-7.
- Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich, and A. Kokesova. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 93:97-108.
- Tonks, N.K. 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell.* 121:667-70.
- Tonks, N.K. 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:833-46.

- Torres, M.A., J.L. Dangl, and J.D. Jones. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:517-22.
- Torres, M.A., H. Onouchi, S. Hamada, C. Machida, K.E. Hammond-Kosack, and J.D. Jones. 1998. Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J*. 14:365-70.
- Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada. 2007. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*. 44:3100-11.
- Ushio-Fukai, M. 2006. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE*. 2006:re8.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44-84.
- Vavricka, S.R., M.W. Musch, J.E. Chang, Y. Nakagawa, K. Phanvijhitsiri, T.S. Waypa, D. Merlin, O. Schneewind, and E.B. Chang. 2004. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*. 127:1401-9.
- Vavricka, S.R., M.W. Musch, M. Fujiya, K. Kles, L. Chang, J.J. Eloranta, G.A. Kullak-Ublick, K. Drabik, D. Merlin, and E.B. Chang. 2006. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma increase PepT1 expression and activity in the human colon carcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine. *Pflugers Arch*. 452:71-80.
- Viala, J., C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, and R.L. Ferrero. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 5:1166-74.
- Vilhardt, F., and B. van Deurs. 2004. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J*. 23:739-48.
- Voss, E., J. Wehkamp, K. Wehkamp, E.F. Stange, J.M. Schroder, and J. Harder. 2006. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*. 281:2005-11.
- Waters, C.M., and B.L. Bassler. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:319-46.
- Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schaffeler, M. Schlee, K.R. Herrlinger, A. Stallmach, F. Noack, P. Fritz, J.M. Schroder, C.L. Bevins, K. Fellermann, and E.F. Stange. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 53:1658-64.

- Weichert, D., J. Gobom, S. Klopffleisch, R. Hasler, N. Gustavsson, S. Billmann, H. Lehrach, D. Seegert, S. Schreiber, and P. Rosenstiel. 2006. Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells. *J Biol Chem.* 281:2380-9.
- Werlin, S.L., M.J. Chusid, J. Caya, and H.W. Oechler. 1982. Colitis in chronic granulomatous disease. *Gastroenterology.* 82:328-31.
- Werts, C., S.E. Girardin, and D.J. Philpott. 2006. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ.* 13:798-815.
- Widdicombe, J. 1995. Relationships among the composition of mucus, epithelial lining liquid, and adhesion of microorganisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:2088-92; discussion 2092-3.
- [www.internisten-im-netz.de](http://www.internisten-im-netz.de). 2008. Lokalisation CED. Vol. 2008.
- [www.kompetenznetz-ced.de](http://www.kompetenznetz-ced.de). 2008. Lokalisation CED. Vol. 2008.
- Yamamoto-Furusho, J.K., and D.K. Podolsky. 2007. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 13:5577-80.
- Yang, F., H.S. Oz, S. Barve, W.J. de Villiers, C.J. McClain, and G.W. Varilek. 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol.* 60:528-33.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y.M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 175:2851-8.
- Youn, H.S., H.J. Lim, Y.J. Choi, J.Y. Lee, M.Y. Lee, and J.H. Ryu. 2008. Selenium suppresses the activation of transcription factor NF-kappa B and IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists. *Int Immunopharmacol.* 8:495-501.
- Zamproni, I., H. Grasberger, F. Cortinovis, M.C. Vigone, G. Chiumello, S. Mora, K. Onigata, L. Fugazzola, S. Refetoff, L. Persani, and G. Weber. 2008. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:605-10.
- Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 64:3854-9.

## 8 Anhang

**Tabelle 8-1: Familie der Toll-like-Rezeptoren.**

modifiziert nach (Takeda und Akira, 2005; Yamamoto-Furusho und Podolsky, 2007).

Rezeptor	Ligand (PAMP)	Adaptormoleküle	Lokalisation
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	MyD88, MAL	Plasmamembran
TLR2	Lipoprotein, Lipopeptide	MyD88, MAL	Plasmamembran
TLR3	dsRNA	TRIF	Endosom
TLR4	LPS	MAL, TRAM, MyD88, TRIF	Plasmamembran
TLR5	Flagellin	MyD88	Plasmamembran
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	MyD88, MAL	Plasmamembran
TLR7/8	ssRNA	MyD88	Endosom
TLR9	Nicht-methylierte CpG-DNA	MyD88	Endosom
TLR11	Komponenten von uropathogenen Bakterien	MyD88	Plasmamembran

### 8.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A. bidest. angesetzt. Die Medien für die Bakterienkultur wurden autoklaviert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gekühlt.

**Tabelle 8.2: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol
25x TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
2x DLB	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2 % (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
5x PBS	40 g/l NaCl, 5,8 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g/l KCl
5x SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
IP-Lysepuffer	1x PBS + 1 % Triton X100
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar Agar
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
RIPA	150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,5 % Na-desoxychelate, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8
S.O.C.-Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 0,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

## 8.2 Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme

**Tabelle 8.3: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien, Zusätze und Enzyme.**

Bezeichnung	Hersteller
6-Amino-Capronsäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	BioRad, München
Agar Noble	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, München
AmpliTaQ DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Bacillol	Bode Chemie, Hamburg
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Bam</i> HI	NEB, Frankfurt
Bodipy	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA-Lösung (10mg/ml)	NEB, Bad Schwalbach
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, München
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Cell Culture Freezing Medium-DMSO	Invitrogen, Karlsruhe
DCFH-DA	Molecular Probes, Göttingen
DEPC	Sigma, München
DMSO	Sigma, München
dNTP Set (100 mM-Lösung)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Calbiochem, Bad Soden
EGTA	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
FuGENE	Roche, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, München
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (MMP)	BioRad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Muramyldipeptid	Bachem, Heidelberg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, München
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
1x PBS	PAA Laboratories, Linz
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen



Bezeichnung	Hersteller
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad, München
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz
<i>Sa</i> II	New England Biolabs, Frankfurt
SDS	Calbiochem, Bad Soden
SmartLadder DNA Markers	Eurogentec, Köln
50x TAE Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma, München
TGS protein electrophoresis buffer 10x Tris/Glycin/SDS	BioRad, München
TNF- $\alpha$	R&S Systems
Tris	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung	Sigma, München
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Sigma, München
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

### 8.3 Verwendete Kits

**Tabelle 8.4: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits.**

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
DC Protein Assay	BioRad, München
DNase I	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase-Assay	Promega, Mannheim
ECL-PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg
Interleukin-8-ELISA KIT	Biosource, Karlsruhe
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Platinum Taq DNA polymerase high fidelity Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAShredder Homogenizer Kit	Qiagen, Hilden
Rac1-Activation Kit	Pierce, Rockford, IL
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega, Mannheim
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim

## 8.4 Vektoren

**Tabelle 8.5: Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Hersteller verwendeter Plasmide.**

Bezeichnung	Antibiotikaresistenz	Hersteller
pcDNA3.1(+)	Neo/Amp	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1-Rac1	Neo/Amp	freundlicherweise von H. Ungefroren zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1-Rac1N17	Neo/Amp	freundlicherweise von H. Ungefroren zur Verfügung gestellt
pEGFP-N1	Neo/Amp	Clontech, Heidelberg
pCMV-MYC	Neo/Amp	Clontech, Heidelberg
pcDNA3.1-NOD2	Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pCEV-CARDS	Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pCEV-NBD	Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pCEV-LRRs	Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pEGFP-C3-NOD2-S	Neo/Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pCMV-NOD2-S	Amp	(Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006)
pcDNA3.1-DUOX2	Neo/Amp	freundlicherweise von H. Grasberger zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1-DUOX2-HA	Neo/Amp	freundlicherweise von H. Grasberger zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1-DUOXA2	Neo/Amp	freundlicherweise von H. Grasberger zur Verfügung gestellt
pEGFP-NOX1	Neo/Amp	freundlicherweise von E. Meccia zur Verfügung gestellt
pNF $\kappa$ B-LUC	Amp	Clontech, Heidelberg
pRL-TK	Amp	Promega, Mannheim

## 8.5 Oligonukleotide

**Tabelle 8.6: Verwendete Oligonukleotide.**

$T_{\text{anneal}}$  = Primerhybridisierungstemperatur, RT = Reverse-Transkriptase-PCR, KP = Klonierungsprimer, SP = Sequenzierungsprimer.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	$T_{\text{anneal}}$ (C°)	Applikation
$\beta$ -Actin_s $\beta$ -Actin_a	GATGGTGGGCATGGGTCAG CTTAATGTCACGCACGATTTCC	55	RT
NOD2_s NOD2_a	CGTTCTGCACAAGGCCTACC TCCATTGCTTTACACGTG	60	RT
GAPDH_s GAPDH_a	CCAGCCGAGCCACATCGC ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	56	RT
Duox1_s DUOX1_as	GCGCGAATTCATGGGCTTCTGCCTGGCTCTAG GCGCGGTACCCGAAGTTCTCATAATGGTGGGAG	55	KP
DUOX2_s DUOX2_as	GCGCGTCGACATGCTCCGTGCAAGACCAGAG GCGCGGTACCCGAAGTT CTCATA GTGGTGCATG	55	KP
NOX4_s NOX4_as	GCGCGTCGACATGGCTGTGTCCTGGAGGAGCTG GCGCGGTACCCTCAGCTGAAAGACTCTTTATTG	55	KP
#3s_NOXA1 #3as_NOXA1	CCTGGGAGGTGCTACACAATG TTGGGGAGTCCATGATTAGG	53	RT
#4s_NOXO1 #4as_NOXO1	CAGATCAAGAGGCTCCAAA GTGTCCTGGGTACAGAAGG	52	RT
#8s_rac1 #8as_rac1	GAATCTGGGCTTATGGGATACA GAGGGGCTGAGACATTTACAAC	56	RT
#9s_NOX4 #9as_NOX4	GGGCTTCCACTCAGTCTTTG GTTGAGGGCATTACACAGAT	56	RT
#13s_Duox1 #13 as_Duox1	TTCACGCAGCTCTGTGTCAA AGGGACAGATCATATCCTGGCT	57	RT
#14s_Duox2 #14as_Duox2	ACGCAGCTCTGTGTCAAAGGT TGATGAACGAGACTCGACAGC	58	RT
#15s_DuoxA2 #15as_DuoxA2	ACAGTGAACACCAACACATCCT CCTGTGAGTGTAATATTAATGCCC	55	RT
#17s_NoX1 #17as_NoX1	CTGTTTGTGGATGCCTTCCT ACCAGCTTGTGGAAGGTGAG	54	RT
Nod2_Seq1_s	CATTGTCAGGAGGCTCC	50	SP
Nod2_Seq2_s	CCTCAATGACGATGCG	51	SP
Nod2_Seq3_s	CTGTGTCGGCGTTCC	50	SP
Nod2_Seq4_s	CAGCCCTGATGACATTC	51	SP
Nod2_Seq5_s	CATCCCGCCAGCTG	51	SP
Nod2_Seq6_s	TGCAGGCAGAACTTCTTG	52	SP

## 8.6 Antikörper

**Tabelle 8.7: Verwendete Primärantikörper.**

Die Antikörper wurden mit TTBS verdünnt, der mit MMP supplementiert wurde. Ms, rb, gt bezeichnet die Spezies des IgG (ms = Maus, rb = Kaninchen, gt = Ziege). Die Prozentangabe (w/v) bezieht sich auf die Blocking-Substanz. MMP = Magermilchpulver, WB = Western-Blot, IHC = Immunhistochemie

Ziel-protein	Bezeichnung	Spezies, Applikation, Verdünnung	Hersteller
β-Actin	Anti-β-Actin	ms, WB 1:60.000 (5 % MMP)	Sigma-Aldrich
GAPDH	Anti-GAPDH	ms, WB 1:500 (5 % MMP)	Santa Cruz
NOD2	Anti-NOD2 (NT)	rb, WB 1:250 (5 % MMP), IHC 1:200	ProSci, Poway
p-IκBα	anti-(phospho-)IκBα	rb, WB 1:1000 (5 % MMP)	CST
FLAG	Anti-FLAG M2 Antibody	ms, WB 1:2.000 (5 % MMP), ICH 1:500	Stratagene
GFP	A.v. monoclonal Antibody (JL-8)	ms, WB 1:2.000 (5 % MMP)	Clontech
GFP	A.v. Peptide Antibody	rb, WB 1:2.000 (5 % MMP)	Clontech
MYC	c-Myc monoclonal antibody	ms, WB 1:500 (5 % MMP), ICH 1:250	Clontech
HA	HA-tag polyclonal antibody	rb, WB 1:500 (5 % MMP), ICH 1:250	Clontech
NOX1	Anti-NOX1	gt, WB 1:500 (5 % MMP), ICH 1:100	Santa Cruz
DUOX2	Anti-DUOX2	gt, WB 1:500 (5 % MMP), ICH 1:100	Santa Cruz
Rac1	Anti-Rac1	rb, WB 1:500 (5 % MMP)	Pierce
Xpress	Anti-Xpress	ms, WB 1:2.000 (5 % MMP)	Invitrogen

**Tabelle 8.8: Verwendete Sekundärantikörper.**

Bezeichnung	Hersteller
anti-Rabbit-HRP	Amersham
anti-Mouse-HRP	Amersham
anti-Goat-HRP	Amersham
anti-rabbit-IgG-FITC	Sigma
anti-Mouse-IgG-Cy3	Molecular probes
anti-Mouse-IgG-AlexaFluor488	Molecular probes

## 8.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die intestinale Barriere.....	2
Abbildung 1-2: Subzelluläre Lokalisation ausgewählter PAMP-Rezeptoren und an der Signaltransduktion beteiligter Proteine. ....	5
Abbildung 1-3: Mechanismen der NLR-Aktivierung. ....	7
Abbildung 1-4: Peptidoglykan als Bestandteil der bakteriellen Zellwand.....	9
Abbildung 1-5: Domänenstruktur von NOD2 und APAF-1.....	10
Abbildung 1-6: Modell der NOD2-Signalgebung. ....	10
Abbildung 1-7: Klassischer NF- $\kappa$ B-Signalweg. ....	11
Abbildung 1-8: Computergestützte dreidimensionale Darstellung der LRR-Domäne von NOD2.....	12
Abbildung 1-9: Manifestationsorte chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. ....	13
Abbildung 1-10: Pathogenese von CED bei genetischer Prädisposition. ....	14
Abbildung 1-11: Darstellung von ROS und ihren Wirkungen auf die Zelle. ....	15
Abbildung 1-12: Domänenstruktur von NOX-Familienmitgliedern. ....	17
Abbildung 1-13: Aufbau und Aktivierung der Phagozyten NADPH-Oxidase. ....	18
Abbildung 1-14: Strukturelle Organisation von NOX-Familienmitgliedern. ....	19
Abbildung 2-1: Schema der PCR-basierten Amplifikation der Ziel-DNA mit Hilfe eines Primerpaares	31
Abbildung 3-1: Experimentelles „Design“ der cDCF-Messung im 96- <i>well</i> -Format. ....	44
Abbildung 3-2: Auswertung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Positivkontrolle im cDCF-Assay. ....	45
Abbildung 3-3: Nachweis von NOD2-abhängig generierten ROS in Epithelzellen. ....	45
Abbildung 3-4: Nachweis von MDP-abhängig generierten ROS in murinen primären Kolonepithelzellen von Wildtyp- <i>littermate</i> (WT)- und NOD2-defizienten-Mäusen. ....	46
Abbildung 3-5: Einfluss von Antioxidantien auf die MDP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung. ....	47
Abbildung 3-6: Einfluss von DPI auf die NOD2-abhängige ROS-Produktion und IL-8 Sekretion.....	48
Abbildung 3-7: siRNA-vermitteltes <i>gene-silencing</i> von NOX1, DUOX2 und NOX4.....	49
Abbildung 3-8: siRNA-vermitteltes <i>gene-silencing</i> von NOX1. ....	49
Abbildung 3-9: siRNA-vermittelte Effekte auf die NOD2-abhängige ROS-Produktion in Caco-2 Zellen. ....	50
Abbildung 3-10: NOX4-siRNA-vermittelte Effekte auf die NOD2-abhängige IL-8-Sekretion in HEK-293 Zellen.....	50
Abbildung 3-11: Nachweis der MDP- und Listerien-induzierten Rac1-Aktivierung.....	52
Abbildung 3-12. Einfluss von Rac1N17 auf die NOD2-vermittelte ROS-Produktion. ....	53
Abbildung 3-13: Einfluss von Rac1N17 auf die NOD2-vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung. ....	54
Abbildung 3-14: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen, NOXO1, NOXA1 und Rac1.....	55
Abbildung 3-15: Zeit- und dosisabhängige Regulation der NOX1- und DUOX2-Expression durch TNF- $\alpha$ . ....	56

---

Abbildung 3-16: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen in Kolonbiopsien von CED-Patienten. ..	57
Abbildung 3-17: Expressionsanalyse von NADPH-Oxidasen in Kolonbiopsien von unbehandelten und DSS-behandelten Mäusen. ....	58
Abbildung 3-18: Regulation der Expression von <i>NOX4</i> und <i>DUOX2</i> durch Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	58
Abbildung 3-19: Nachweis der Interaktion von NOD2 und DUOX2. ....	59
Abbildung 3-20: Nachweis der Kolokalisation von NOD2 und DUOX2. ....	60
Abbildung 3-21: Nachweis der Kolokalisation von NOD2 und NOX1. ....	61
Abbildung 3-22: NOX1-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion in Caco-2 Zellen. ....	62
Abbildung 3-23: DUOX2-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion. ....	63
Abbildung 3-24: NOX1- und DUOX2-siRNA-vermittelte Effekte auf die bakterielle Zellinvasion. ....	64
Abbildung 3-25: Effekte von NOD2 und DUOX2 auf die bakterielle Zyotinvasion. ....	65
Abbildung 4-1: Hypothetisches Schema der NOD2-vermittelten ROS-Produktion durch NOX4 in HEK-293 Zellen (oben) und NOX1 und DUOX2 in Caco-2 Zellen (unten). ....	70
Abbildung 4-2: Hypothetisches Schema der Evolution von NOX-Enzymen. ....	73
Abbildung 4-3: Redox-Zyklus. ....	76
Abbildung 4-4: Reversible Oxidation von PTPB1 der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. ....	77
Abbildung 4-5: Bedeutung von NOD2 und der Redox-Homöostase für die Integrität der intestinalen Barriere. ....	79

## 8.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Familie der NLR-Rezeptoren. Modifiziert nach (Ting et al., 2008).....	6
Tabelle 1-2: Epidemiologische Daten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. ....	13
Tabelle 1-3: Expression von NADPH-Oxidase-Familienmitgliedern. ....	20
Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien.....	22
Tabelle 2-2: Verwendete Zellkulturformate. ....	24
Tabelle 2-3: Verwendete Formate und Volumina für DNA-Transfektionsansätze. ....	25
Tabelle 2-4: Verwendete Formate und Volumina für siRNA-Transfektion. ....	25
Tabelle 2-5: GAPDH-Kontroll-PCR. ....	28
Tabelle 2-6: Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.....	29
Tabelle 2-7: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR. ....	30
Tabelle 2-8: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer Klonierungs-PCR.....	31
Tabelle 2-9: Exemplarische Zusammensetzung einer Doppelrestriktion.....	32
Tabelle 2-10: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes. ....	33
Tabelle 2-11: Reaktionsansatz für eine Sequenzierung (links) und Programmierung des Thermocyclers (rechts). ....	35
Tabelle 2-12: Zusammensetzung eines Trenngels.....	36
Tabelle 2-13: Zusammensetzung eines Sammelgels. ....	36
Tabelle 2-14: Verwendete Antikörper und Verdünnungen zur Immundetektion. ....	38
Tabelle 2-15: Verwendete Konstrukte und Antikörper für die Koimmunpräzipitation. ....	38
Tabelle 2-16: Verwendete Plasmide und Antikörper der Immunhistochemie. ....	42
Tabelle 2-17: Filtersätze für Fluoreszenzmikroskopie.....	42
Tabelle 8-1: Familie der Toll-like-Rezeptoren. ....	100
Tabelle 8.2: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien.....	100
Tabelle 8.3: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien, Zusätze und Enzyme. ....	101
Tabelle 8.4: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits. ....	102
Tabelle 8.5: Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Hersteller verwendeter Plasmide. ....	103
Tabelle 8.6: Verwendete Oligonukleotide. ....	104
Tabelle 8.7: Verwendete Primärantikörper.....	105
Tabelle 8.8: Verwendete Sekundärantikörper. ....	105
Tabelle 8-9. Abkürzungen .....	109

## 8.9 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 8-9. Abkürzungen

Abk.	Vollständige Bezeichnung
Amp	Ampicillin
AMP	Antimikrobielle Peptide
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APAF1	<i>apoptotic protease-activating factor1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bid.	Aqua bidestilliert
ASC	<i>apoptosis associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
BIR	<i>baculovirus inhibitory of apoptosis repeat</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C-	carboxy-
ca.	<i>circa</i>
cagPAI	<i>cag-pathogenicity-island</i>
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
CD	<i>Crohn disease</i>
cDCF	Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CFU	<i>colony-forming-units</i>
COX2	Zyklooxygenase 2
DAI	<i>DNA-dependent activator of IRFs</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DPI	Diphenyliodonium
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
DSS	<i>dextran sodium sulfate</i>
DUOX	Duale Oxidase
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
ERBIN	<i>ErbB2 interacting protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>



FADD	<i>FAS-associated via death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GRIM19	<i>gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HGF-R	<i>hepatocyte growth factor-receptor</i>
HN	<i>healthy normal individual</i>
HR	Hypersensitive Reaktion
IB	Immunblot
ICE	<i>interleukin-1 converting enzyme</i>
IEC	<i>intestinal epithelial cell</i>
iE-DAP	<i><math>\gamma</math>-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid</i>
IFN	Interferon
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, Alpha</i>
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL-8	Interleukin-8
IP	Koimmunpräzipitation
IPAF	<i>ICE-protease activating factor</i>
IPS-1	<i>IFNB-promoter stimulator-1</i>
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LMW-PTPs	<i>Low-molecular-weight-PTP</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
LTA	<i>lipoteichoic acid</i>
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MDP	<i>muramyl dipeptide</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>

NACHT	NAIP, CIITA, HET-E and TP1
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR- and PYD-domain-containing protein</i>
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
Neo	Neomycin
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NLR	<i>NOD-like/NBD-LRR-receptor (nucleotid-binding domain and leucine-rich-repeats containing)</i>
NO	<i>nitric oxygen</i>
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NOX	NADPH-Oxidase
OAS-1	2',5'-Oligoadenylat-Synthetase-1
p38	p38 MAP-Kinase
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGN	Peptidoglykan
PKC	Proteinkinase C
poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PRx	Peroxiredoxin
PtdIns(4,5)P2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PTPs	<i>phospho-tyrosin-phosphatase</i>
PVDF	Polyvinylidifluorid
PYD	<i>pyrin domain</i>
Rac 1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RIP2	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>
RLH	<i>RIG-I-like RNA helicase</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rnase	Ribonuklease
R-Proteine	Resistenz-Proteine
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>reverse transkriptase</i>
SiRNA	<i>small interferenz RNA</i>

---

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD	Superoxiddismutase
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
TAK	<i>TGF<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TIR	Toll/IL-1R
THP	<i>3<math>\alpha</math>,5<math>\alpha</math>-tetrahydroprogesterone</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TR	Thioredoxin-Reduktase
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN</i>
UC	<i>ulcerative colitis</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
WB	Western-Blot
Wt	Wildtyp

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von den Beratungen durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Simone Lipinski)

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Simone Lipinski  
Geburtstag: 14.08.1979  
Geburtsort: Wiesbaden  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet mit Bastian Schröder  
derzeitige Anschrift: Muhliusstr. 49a, 24103 Kiel

### SCHULISCHER WERDEGANG

---

06/1999                      Abitur am Augustinergymnasium Friedberg (Hessen)

### STUDIUM

---

10/1999 bis 04/2005      Studium der Oecotrophologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
09/2003 bis 04/2004      Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Expression und Prozessierung der Metacaspasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Plasmodium falciparum*“  
                                    Institut für Biochemie der Ernährung,  
                                    Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg  
04/2005                      Diplomprüfung, Gesamtnote – sehr gut –

### PRAKTIKA

---

12/2000 bis 03/2001      Ernährungswissenschaftliches Praktikum  
                                    Entwicklungshilfeprojekt PROCEDI, Guatemala  
07/2004 bis 10/2004      Forschungsaufenthalt am *Department of Nutrition and Health Sciences*, Arbeitsgruppe *Molecular Nutrition*,  
                                    Prof. Dr. J. Zemleni, Universität Nebraska-Lincoln, USA

### STIPENDIEN

---

09/2000 bis 04/2005      Stipendiatin des evangelischen Studienwerkes Villigst e.V.  
10/2005 bis 03/2008      Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 820

### PROMOTION

---

10/2005 bis 10/2008      Institut für Klinische Molekularbiologie,  
                                    Leitung: Prof. Dr. Stefan Schreiber,  
                                    Arbeitsgruppe Zellbiologie, Prof. Dr. Philip Rosenstiel,  
                                    Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## Publikationen und Tagungsbeiträge

S. Lipinski, A. Till, C. Sina, H. Grasberger, S. Schreiber, P. Rosenstiel

*“Reactive oxygen species are mediators and effectors of NOD2-induced signalling”*

Jl, submitted

S. Lipinski, A. Till, P. Rosenstiel, S. Schreiber

*„ROS and antioxidants - Role in proinflammatory signalling”*

42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung, Kiel 2007 (Poster)

A. Till, S. Lipinski, S. Künzel, S. Billmann, J. Gobom, R. Haesler, H. Lehrach, S. Schreiber, P. Rosenstiel

*“Systematic Analysis of NOD2-dependent Transcriptome and Proteome Signature Patterns upon Muramyl-dipeptide Stimulation”*

10. Tagung der Gesellschaft für Signaltransduktion (GST), Weimar 2006 (Poster)

S. Lipinski, A. Till, P. Rosenstiel, S. Schreiber

*“Reactive oxygen species (ROS) - Intracellular messengers of innate immunity?”*

Tagung des Graduiertenkollegs 820, Salzbau 2006 (Poster)

S. Lipinski

*“Reactive oxygen species (ROS) - Intracellular messengers of innate immunity?”*

57. Mosbacher Kolloquium: *Redox Signaling: Mechanism and Biological Impact*, Mosbach 2006 (oral presentation)

## Posterpreis

S. Lipinski, A. Till, P. Rosenstiel, S. Schreiber

*„ROS and antioxidants - Role in proinflammatory signalling”*

42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung, Kiel 2007

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber für die Möglichkeit, im exzellenten Forschungsumfeld des Instituts für Klinische Molekularbiologie arbeiten zu können.

Frau Prof. Dr. Karin Krupinska danke ich für die Gelegenheit zum interdisziplinären Austausch im Rahmen des GRKs, für die Betreuung und ihr Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Philip Rosenstiel für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die aufschlussreichen Diskussionen und die Freiheit eigene Ideen umsetzen zu können.

Bei Dr. Andreas Till möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende fachliche Betreuung bedanken. Seine wertvollen Anregungen, stetige Diskussionsbereitschaft und ansteckende Begeisterung für Wissenschaft und Forschung haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Olga Gavrilova und Herrn Dr. Christian Sina danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Maus-Experimente.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des IKMBs, vor allem der Zellbiologie. Die freundschaftliche und außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre trägt großen Anteil an meiner Motivation und Freude am Experimentieren. Besonders danke ich Yasmin Brodtmann und Alina Gräff für ihren engagierten Einsatz in der Zellkultur und ebenso Tanja Kaacksteen, Melanie Schlapkohl und Maren Reffermann für ihre tatkräftige Unterstützung bei Experimenten oder der Suche nach Reagenzien, Plasmiden etc.

Für den vielfältigen Austausch über Ergebnisse, methodische Vorgehensweisen oder auch den Nicht-Laboralltag danke ich Dr. Gunnar Jacobs, Dr. Susanne Billmann, Stefanie Derer, Sven Künzel, Dr. Oliver von Kampen, Henning Sudhaus, Nils Grabe und Ulrich Klostermeier.

Mein Dank gilt darüber hinaus Dr. Gunnar Jacobs und Hartmuth Schröder für das sorgfältige Korrekturlesen.

Meine Anerkennung und Wertschätzung gilt von ganzem Herzen meiner Familie. Euch und lieben Freunden danke ich für die erlebnisreichen Besuche im hohen Norden, Eure fürsorgliche und beständige Unterstützung.

Schließlich danke ich Bastian für seine liebevolle Art, mir Ausgeglichenheit und Kraft zu schenken.